

Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en
Biociencias Moleculares

Contribución del Interferón a la citopatogenicidad causada por el virus de la bursitis infecciosa (IBDV)

Tesis Doctoral

Liliana Lilibeth Cubas Gaona

Madrid, 2017

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Contribución del Interferón a la citopatogenicidad causada por el virus de la bursitis infecciosa (IBDV)

Memoria de Investigación presentada por **Liliana Lilibeth Cubas Gaona**,
Licenciada en Biología, para optar al grado de
Doctor en Biociencias por la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por la Doctora Dolores Rodríguez Aguirre
y el Doctor José Francisco Rodríguez Aguirre

Fdo. Dolores Rodríguez Aguirre

Fdo. José Francisco Rodríguez Aguirre

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral concedida por la Fundación La Caixa desde Noviembre del 2013 hasta octubre del 2017.

AGRADECIMIENTOS

No quiero empezar este apartado sin antes agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Dolores Rodríguez y el Dr. Francisco Rodríguez, Lolo y Paco. Gracias a los dos por estos años de aprendizaje y conocimientos. Gracias especialmente a ti Lolo por permitir que entrase en este nuevo mundo de la Virología, por saberme llevar de la mano y explicarme cada cosa con tanto cariño, gracias por ese perfeccionismo que te caracteriza, créeme que he aprendido mucho de ello, por las bolsas de sugus y galletitas al final del día. Gracias a ti también Paco por tu sabiduría, por mostrarme este mundo desde otro punto de vista, sin duda contigo se puede aprender muchísimas cosas.

Mis compañeros del 113, hemos sido unos cuantos desde que empecé allá por el 2013. Tengo que agradecerte Gliselle por ayudarme en mis primeros pasos por el laboratorio, me lo explicaste todo tan bien y con tanta alegría que era imposible no aprender, gracias por escucharme cuando necesitaba hablar. Ginés, qué importante has sido durante este tiempo en este trabajo, gracias por los mil consejos y por hacerme cuestionar cada cosa que te preguntaba, sin duda has iluminado muchas veces mi camino. Eli sencillamente me encantas, tu sinceridad, tu forma de decir las cosas, nunca cambies, gracias por ayudarme tanto en esta última parte de la escritura de la tesis, por aguantar mis idas y venidas de cabeza, ahora te quedas con la batuta del laboratorio, no dudes de ti, aunque no lo creas, eres capaz de mucho más de lo que te imaginas. Ana, tú siempre tan divina, eres encantadora, somos con Eli, las chicas de Lolo! Agradecer también a los compis del grupo de Marta Nieto. Carlos, la alegría del laboratorio, el Dj, cuántas cosas he aprendido contigo, gracias por la ayuda con los CRISPRs, gracias por motivarme con los Adobes, eres una máquina. Noelia, me encanta verte llegar, porque siempre entras con una sonrisa, gracias por venir a mi mesa y preguntarme cómo estoy, por esas risas, por esos bailes indecentes a los que nos hemos visto expuestas, por esos pulsos, por esa mente tan brillante. Linnea, gracias por siempre preocuparte por todos, por darle mucha más importancia a las cosas que uno mismo, cuando realmente la merecían, por darnos tartas, dulces, frutos secos... Sin duda no solo he encontrado compañeros fabulosos en este laboratorio, sino a amigos que me han hecho sentir arropada, mimada, cuidada, no les puedo pedir más, porque son lo más, me lo he pasado chachi piruli.

A mis compañeros del 117 Fernando, Antonio, Nico y Dani. Gracias Fer por todos los consejos, por mirarme las QM7 cada vez que te pedía para saber si titular o no, tu ojo crítico y experto han sido clave en mi aprendizaje con IBDV. Antonio, sin tu ayuda no hubiese obtenido el IFN de pollo, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme en todo lo que te pedía. Nico, gracias por acudir a mí cuando has tenido dudas científicas sobre el IFN, me has hecho sentir especial. No quiero dejar de mencionar a Romy y Gema, que fueron personas importantes en el inicio de mi tesis, sin su ayuda y consejos no hubiera sabido cómo trabajar correctamente con IBDV. Gracias Ana por tener siempre una sonrisa, por ayudarme con tanta paciencia con el ÄKTA.

Quiero agradecer al resto de compañeros del Departamento de Biología Molecular y Celular del CNB, por siempre prestarme su ayuda, sus conocimientos, sus críticas constructivas. Quiero agradecer al Dr. Davide Seruggia por su ayuda en los CRISPR-Cas9, sin ella hubiera sido tarea imposible conseguir las DF-1-PKR. A Lucía, Silvia, Victoria, Gema, Martina F., Paz, Noelia.... gracias por las risas por los pasillos, por las conversaciones en cultivos y en el baño, por la ayuda y el cariño. A Laura por los cafés/infusiones compartidos, por esas conversaciones de todo un poco, por compartir las ideas de nuestras bodas. También quiero agradecer al resto del personal del CNB, a los servicios de Microscopía Confocal, Microscopía electrónica y Citometría de Flujo. Agradecer a María y Juanra, por su ayuda con las figuras de la tesis y las correcciones de la misma.

Quiero agradecer también al Dr. Adolfo García Sastre por permitirme ir a su laboratorio a realizar mi estancia. A la Dra. María Teresa Aparicio, Maite, por recibirme tan calurosamente y enseñarme tan bien, gracias a todos los compañeros que conocí en este laboratorio y que me ayudaron en todo. También agradecer al Dr. Nicolas Eterradosi y al Dr. Sébastien Soubies por permitirme realizar uno de los experimentos más importante de mi tesis en su laboratorio, su acogida fue sin duda una gran experiencia.

Fuera del ámbito profesional, quiero agradecer a mis padres, GRACIAS en mayúscula por todo el esfuerzo que hicieron en venir a España y el sacrificio de dejarnos en Perú creo que ha dado un pequeño fruto y, esta tesis que también es de Ustedes puede ser ejemplo de ello. Gracias papi por sentirte tan orgullosos, por esa confianza incalculable que tienes depositada en mí. Mamita, tus ánimos, tu amor, tus fuerzas, tu perseverancia, todo ello siempre ha sido el motor de mi vida. Gracias por esos *tupperwares* de comida que me dabas sin pedírtelo. A mis hermanos Edwing, Christian y Carlos, a mis primos Roxana y José, a mis sobrinos Angie, Fershie, Aurora, Thiago y Mirella gracias por entender cuando tenía que salir corriendo de las reuniones familiares, por intentar entender mi trabajo, por darme fuerzas y ánimos. Gracias cuñis, Betsa, por prestarme tu ayuda incondicional, por ayudarnos con detalles de la boda mientras Dani y yo estábamos full de trabajo. Angie, mi niña,

gracias por hacerme sentir tan importante en tu vida.

Quiero agradecerte enormemente a ti Dani, porque has sido quién realmente ha sufrido esta tesis conmigo, gracias por leerte cada apartado y corregirlos, por corregir mis despistes durante la escritura, por cogerme de la mano y a tu manera, volverme a encauzar. Por escucharme cuando las cosas no salían bien y darme las fuerzas para volverlo a intentar, por calmarme, por intentar siempre estar dispuesto y ayudarme.

GRACIAS

A mis padres y a Dani

RESUMEN

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) pertenece a la familia *Birnaviridae*, la cual incluye virus desnudos cuyo genoma consiste en dos segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que se encuentran dentro de una única cápsida icosaédrica. El genoma se encuentra en forma de complejos ribonucleoproteicos (RNPs), donde el dsRNA está envuelto por la proteína viral VP3 y unido de forma covalente a la polimerasa viral VP1. IBDV es el agente etiológico de una enfermedad inmunodepresora altamente contagiosa (IBD) que afecta a pollos domésticos juveniles (*Gallus gallus*). La enfermedad causada por IBDV o enfermedad de Gumboro conduce a una alta mortalidad de los animales infectados, y es responsable de grandes pérdidas económicas en la industria aviar a nivel mundial. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida masiva de linfocitos B inmaduros, causando la destrucción de la bolsa de Fabricio, que es el órgano linfoide principal en aves. Hasta el momento, se tiene un escaso conocimiento acerca de las bases moleculares de la patogenia causada por IBDV. No obstante, hay un creciente grupo de evidencias que apuntan a que una exacerbada respuesta inmune, caracterizada por una secreción desmesurada de citoquinas proinflamatorias, junto con la destrucción de los linfocitos B por apoptosis, son los principales factores que contribuyen a la gravedad de la enfermedad.

En esta tesis doctoral se ha estudiado el papel de IFN tipo I y, en menor medida, el del IFN del tipo II, en la infección desencadenada por IBDV tanto en células humanas como en células de pollo. Mientras el pretratamiento con IFN confiere protección frente a la infección por IBDV, la adición de IFN a células previamente infectadas en estadios tempranos de la infección, conduce a una muerte celular masiva por apoptosis, predominantemente a través de la activación de la ruta extrínseca. El bloqueo de la expresión de PKR o TNF- α , o la inhibición del factor de transcripción NF- κ B (NF- κ B) lleva a una reducción drástica de la apoptosis desencadenada en células HeLa, indicando que estas son proteínas críticas en la respuesta apoptótica inducida por IBDV tras el tratamiento con IFN- α . Sin embargo, en las líneas celulares de pollo parece ser que PKR participa de manera parcial durante el desencadenamiento de apoptosis, y que ni TNF- α ni TRAIL son responsables a priori de ejecutar dicha muerte en estas células. Por otro lado, el silenciamiento de la expresión de MAVS indica que la inducción de *IFNB* que se produce en las células infectadas tras el tratamiento con IFN podría no ser crucial en la producción de apoptosis en el sistema *in vitro*, aunque puede tener importancia *in vivo*. Nuestros resultados indican que el dsRNA genómico de IBDV es el factor viral que contribuye a la inducción de apoptosis. Estos descubrimientos proporcionan nuevas evidencias acerca de los posibles mecanismos que conducen al desarrollo de la inmunosupresión y la patogenia en pollos infectados por IBDV.

SUMMARY

Infectious bursal disease virus (IBDV) belongs to the *Birnaviridae* family, which includes non-enveloped viruses containing two double-stranded RNA (dsRNA) segments enclosed within a single icosahedral capsid. Their genome is structured into ribonucleoprotein (RNP) complexes, where the dsRNA is wrapped by the VP3 protein and complexed with the polymerase VP1. IBDV is the etiological agent of a highly contagious and immunosuppressive disease (IBD) that affects juvenile domestic chickens (*Gallus gallus*). IBD or Gumboro disease leads to high mortality of infected animals, and is responsible for major economic losses to the poultry industry world-wide. IBD is characterized by a massive loss of immature B lymphocytes and the destruction of the bursa of Fabricius, the main lymphoid organ in birds. The molecular bases of the IBDV pathogenicity are still poorly understood, nonetheless, there is a growing body of information indicating that an exacerbated cytokine immune response together with a B cell depletion due to apoptosis are the main factors contributing to the severity of the disease.

In this work, we described the role of type I interferon (IFN) and, to a lesser degree, of type II IFN on IBDV infection in both, mammalian and chicken cell lines. While IFN pretreatment confers protection against subsequent IBDV infection, IFN addition to infected cell cultures early after infection drives to a massive apoptotic cell death, predominantly carried out through extrinsic pathway. Downregulation of PKR and TNF- α expression, or inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) reduces drastically the extent of apoptosis in HeLa cells, indicating that these are critical proteins in the apoptotic response induced by IBDV upon treatment with IFN- α . However, PKR plays a partial function in the apoptosis induction in chicken cell lines, and neither TNF- α nor TRAIL are responsible of triggering apoptosis in these cells. Silencing of MAVS expression indicates *IFNB* induction that occurs in infected cells upon IFN treatment could not be relevant in this apoptosis induction in the *in vitro* system, although it could be important *in vivo*. Our results indicate that IBDV genomic dsRNA is the viral factor contributing to apoptosis triggering. These findings provide novel insights into the potential mechanisms of IBDV-induced immunosuppression and pathogenesis in chickens.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	13
SUMMARY.....	15
ABREVIATURAS	29
INTRODUCCIÓN	33
1. Virus de la bursitis infecciosa (IBDV)	35
1.1. Estructura genómica de IBDV	35
1.2. Virión de IBDV	36
1.3. Ciclo de vida de IBDV	38
1.4. Patogenia	39
2. Inmunidad innata del Hospedador	41
2.1. Apoptosis.....	41
2.1.1. Caspasas	42
2.1.2. Rutas apoptóticas.....	43
2.1.2.1. Ruta extrínseca.....	43
2.1.2.2. Ruta intrínseca	43
2.1.3. Regulación de la apoptosis.....	43
2.2. Ruta de señalización mediada por IFN	45
2.2.1. Receptores transmembranales TLR.....	46
2.2.2. Sensores citoplasmáticos RLR	46
2.2.3. Tipos de IFN.....	47
2.3. IFN y apoptosis	49
OBJETIVOS.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Material Biológico	59
1.1. Células eucariotas.....	59
1.2. Células procariotas	60
1.2.1. Condiciones de crecimiento y mantenimiento	60
1.2.2. Preparación de bacterias competentes.....	60
1.2.3. Transformación bacteriana.....	60
1.3. Virus	60
2. Reactivos	61
2.1. Plásmidos	61
2.2. Anticuerpos	62
3. Metodología.....	62

3.1. Infección en medio líquido	62
3.1.1. Infecciones con el virus IBDV.....	62
3.1.2. Infecciones con el virus NDV-GDP	62
3.1.3. Infecciones con el virus rVV-chIFN- α	62
3.2. Titulación de virus	65
3.2.1. Titulación por ensayo de formación de placa de lisis en medio líquido.....	65
3.2.2. Titulación por ensayo de formación de placa de lisis en medio sólido	65
3.2.2.1. Titulación por inmunotinción.....	65
3.2.2.2. Titulación por tinción con cristal violeta	65
3.3. Purificación de viriones de IBDV.....	66
3.4. Purificación de viriones de IBDV por colchón de sacarosa	66
3.5. Purificación de pseudopartículas virales (VLPs)	66
3.6. Transfección de cultivos celulares	67
3.7. Obtención del virus rVV-chIFN- α	67
3.7.1. Preparación del stock del virus rVV-chIFN- α	67
3.8. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos	68
3.8.1. PCR	68
3.8.2. Purificación de DNA.....	68
3.8.3. Clonaje en el plásmido pGEM-T <i>easy vector</i>	68
3.8.4. Clonaje del gen de chIFN- α en el plásmido pVOTE.2.....	68
3.8.5. Extracción de RNA	69
3.8.6. Retrotranscripción del RNA.....	69
3.8.7. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	69
3.9. Manipulación y análisis de proteínas	70
3.9.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y análisis por Western Blot.....	70
3.9.2. Determinación de la concentración de proteínas	71
3.9.3. Análisis cuantitativo de proteínas	72
3.10. Producción y titulación de IFN- α de pollo (chIFN- α)	72
3.10.1. Ensayo de expresión de chIFN- α en células infectadas con el virus rVV-chIFN- α	72
3.10.2. Purificación del chIFN- α	72
3.10.3. Titulación del chIFN- α	73
3.11. Tratamiento con IFN comercial.....	73
3.12. Ensayo biológico	73
3.13. Ensayo de viabilidad celular	73

3.14. Microscopía electrónica	74
3.15. Determinación de apoptosis	74
3.15.1. Activación de las caspasas 3/7, 8 y 9.....	74
3.15.2. Tratamiento con el inhibidor de la PKR	74
3.15.3. Tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132	74
3.15.4. Tratamiento con inhibidores de caspasas	75
3.15.5. Cuantificación de células apoptóticas a tiempo real	75
3.16. Fraccionamiento celular: preparación de extractos nucleares y citosólicos	75
3.17. Silenciamiento génico utilizando vectores lentivirales	75
3.17.1. Generación de partículas lentivirales	75
3.17.2. Titulación de partículas lentivirales.....	76
3.17.3. Obtención de células HeLa silenciadas de forma transitoria para TNF- α utilizando partículas lentivirales	76
3.18. Silenciamiento génico utilizando RNAs silenciadores.....	77
3.19. Deleción de la región de unión a dsRNA del gen PKR de pollo (chPKR) por la tecnología CRISPR/CAS9	77
3.19.1.Diseño de guías	77
3.19.2.Hibridación y clonaje de las secuencias guías en el vector pMLM3636	78
3.19.3.Transfección y clonaje celular en células DF-1	79
RESULTADOS.....	83
1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LÍNEA CELULAR HUMANA (HeLa)	85
1.1. IBDV es sensible a la acción antiviral del IFN- α en células HeLa.....	85
1.2. El tratamiento con IFN- α en células HeLa infectadas con IBDV causa apoptosis	85
1.3. Patrón de expresión de ISGs en células infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α ..	88
1.5. Inducción de la expresión de <i>IFNB</i> y <i>TNFA</i> en células HeLa infectadas y tratadas con IFN- α dependiente de PKR	92
1.6. La apoptosis inducida en células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α depende de la expresión de TNF- α	95
1.7. Activación de NF- κ B en células infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α	95
1.8. La activación de NF- κ B es esencial en la inducción de apoptosis	97
1.9. MAVS e IFN- β no desempeñan un papel importante en el desencadenamiento de la apoptosis.....	99
1.10. La inducción de apoptosis aumenta a lo largo de la infección con IBDV en células tratadas con IFN-α y se correlaciona con la fosforilación de PKR y la expresión génica de <i>IFNB</i>	101

1.11. Producción de apoptosis en células HeLa transfectadas con el RNA genómico de IBDV tras tratamiento con IFN.....	104
1.12. IBDV produce apoptosis a tiempos muy tardíos	106
1.14. Las rutas extrínseca e intrínseca participan en diferente medida en la producción de apoptosis en células HeLa infectadas por IBDV bajo el tratamiento con IFN	108
2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LÍNEAS CELULARES DE POLLO	110
2.1. Producción y purificación de $\text{chIFN-}\alpha$	110
2.1.1. Análisis de la expresión de $\text{chIFN-}\alpha$	110
2.1.2. Purificación de $\text{chIFN-}\alpha$	111
2.1.3. Titulación de $\text{chIFN-}\alpha$	112
2.2. Estudio de la infección por IBDV en células DF-1 bajo el tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$	112
2.2.1. IBDV es sensible a la acción antiviral del $\text{chIFN-}\alpha$ en células DF-1	112
2.2.2. El tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$ en células DF-1 infectadas con IBDV causa apoptosis.....	114
2.2.3. PKR desempeña un papel importante en la ruta de la apoptosis inducida en células DF-1 infectadas con IBDV y tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$	114
2.2.3.1. La inhibición de la actividad de PKR produjo una reducción significativa en la apoptosis desencadenada en las células DF1.	114
2.2.3.2. Generación de células DF-1 carentes de la expresión de PKR por la tecnología CRISPR-Cas9	115
2.2.3.3. PKR participa parcialmente en la apoptosis desencadenada en células DF-1 por IBDV tras tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$	119
2.2.4. La inducción de la expresión de <i>chIFNB</i> y <i>chMDA5</i> en células DF-1 infectadas y tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$ es dependiente de PKR	120
2.3. Estudio de la infección por IBDV en células DT40 bajo el tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$ y $\text{chIFN-}\gamma$	124
2.3.1. El tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$ o $\text{chIFN-}\gamma$ en células DT40 infectadas por IBDV causa apoptosis.....	125
2.3.2. El tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$ o $\text{chIFN-}\gamma$ en células DT40 infectadas por IBDV induce la expresión génica de <i>chIFNB</i>	126
DISCUSIÓN	131
1. EFECTO DEL IFN SOBRE LA INFECCIÓN POR IBDV EN CÉLULAS HeLa.....	133
1.1. El tratamiento con IFN en células HeLa infectadas por IBDV induce una respuesta apoptótica dependiente de PKR.....	134

1.2. La inducción de IFN- β , que es dependiente de PKR, no contribuye a la respuesta apoptótica en células HeLa infectadas y tratadas con IFN	136
1.3. TNF- α y NF- κ B median la respuesta apoptótica en células HeLa infectadas y tratadas con IFN	137
1.4. Contribución de la ruta extrínseca e intrínseca en la apoptosis desencadenada en células HeLa infectadas y tratadas con IFN.....	138
1.5. dsRNA genómico de IBDV como inductor de la apoptosis	138
2. EFECTO DEL IFN SOBRE LA INFECCIÓN POR IBDV EN CÉLULAS DE POLLO	140
2.1. El tratamiento con chIFN- α de células DF-1 infectadas con IBDV induce apoptosis dependiente parcialmente de PKR.....	140
2.2. Otro factor pro-apoptótico, diferente a TNF- α y TRAIL, parece mediar la respuesta apoptótica en células DF-1	142
2.3. Inducción de apoptosis en células DT40 infectadas y tratadas con IFN	143
CONCLUSIONES	147
REFERENCIAS.....	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización genómica de IBDV.....	36
Figura 2. Virión de IBDV.....	37
Figura 3. Esquema de las rutas apoptóticas.....	44
Figura 4. Esquema de la ruta de señalización de IFN tipo I.....	48
Figura 6. IBDV es sensible a la acción antiviral de IFN- α en células HeLa.....	85
Figura 7. El tratamiento con IFN- α induce apoptosis en células HeLa infectadas con IBDV.....	87
Figura 8. Estudio dosis-respuesta del IFN- α en la activación de la apoptosis en células infectadas por IBDV.....	89
Figura 9. La apoptosis inducida en células infectadas y tratadas con IFN- α es dependiente de la expresión de PKR.....	91
Figura 10. La inducción de los genes IFNB y TNFA en células infectadas por IBDV y tratadas con IFN- α es dependiente de la expresión de PKR.....	93
Figura 11. PKR no es la responsable de bloquear la progresión de la infección de IBDV en células infectadas y tratadas con IFN- α	94
Figura 12. El silenciamiento de TNF- α reduce la apoptosis en células infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α	96
Figura 13. Activación de NF- κ B tras tratamiento con IFN- α en células HeLa infectadas con IBDV.....	97
Figura 14. Ensayo de dosis-respuesta del inhibidor MG132 sobre la actividad del proteosoma y la viabilidad celular.....	98
Figura 15. La inhibición de la translocación de p65 por el tratamiento con MG132 previene la apoptosis en células infectadas por IBDV y tratadas con IFN- α	98
Figura 16. MAVS e IFN- β no parecen contribuir a la apoptosis producida en células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α	100
Figura 17. La apoptosis desencadenada en células infectadas por IBDV y tratadas con IFN- α se relaciona directamente con fosforilación de PKR y la expresión de <i>IFNB</i>	102
Figura 18. La replicación del RNA viral y la producción de virus extracelular se reducen en presencia de IFN- α	103
Figura 19. Análisis de la purificación de partículas de IBDV, VLPs y del dsRNA de IBDV.....	105
Figura 20. La transfección con dsRNA genómico de IBDV, pero no la incubación con con VLPs, induce apoptosis tras el tratamiento con IFN- α	106

Figura 21. IBDV induce apoptosis a tiempos tardíos en células HeLa.	107
Figura 22. Los tratamientos con IFN- β e IFN- γ en células infectadas con IBDV inducen apoptosis.....	108
Figura 23. Participación de las rutas extrínseca e intrínseca en la producción de apoptosis en células HeLa infectadas por IBDV bajo tratamiento con IFN- α	109
Figura 24. Análisis de la expresión de chIFN- α en células HeLa infectadas con rVV-chIFN- α	111
Figura 25. Purificación de la proteína chIFN- α	112
Figura 26. Ensayo de funcionalidad de la proteína chIFN- α	113
Figura 27. IBDV es sensible a la acción antiviral de chIFN- α en células DF-1.	113
Figura 28. Apoptosis en células de pollo DF-1 infectadas con IBDV y tratadas con chIFN- α	115
Figura 29. Optimización de las condiciones de transfección para la generación de células DF-1-PKR por la tecnología CRISPR/Cas9.....	116
Figura 30. Generación de una línea estable de células DF-1-PKR por la tecnología CRISPR-Cas9.	118
Figura 31. La apoptosis desencadenada en células DF-1 infectadas con IBDV en presencia de chIFN- α es parcialmente dependiente de la expresión de PKR.	120
Figura 32. Análisis de la expresión génica a 12 h p.i. en células DF-1 infectadas con IBDV y tratadas con chIFN- α	121
Figura 33. Análisis de la expresión génica a 16 h p.i. en células DF-1 infectadas con IBDV y tratadas con chIFN- α	122
Figura 34. PKR no es la responsable de bloquear la progresión de la infección de IBDV en células DF-1 infectadas y tratadas con chIFN- α	123
Figura 35. Ensayo de la actividad biológica del chIFN- γ comercial.	124
Figura 36. Los tratamientos con chIFN- γ y chIFN- α en células DT40 infectadas por IBDV causa apoptosis.	125
Figura 37. Análisis de la expresión génica por qRT-PCT en células DT40 infectadas con IBDV y tratadas con chIFN- α o chIFN- γ	127
Figura 38. IBDV no es sensible a la acción antiviral de chIFN- α y chIFN- γ en células DT40 infectadas y tratadas con dichos IFNs.	128

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de anticuerpos empleados	63
Tabla 2. Cebadores empleados para el estudio por qRT-PCR.....	71
Tabla 3. Secuencia de los shRNA utilizados para el silenciamiento génico de TNF- α	76
Tabla 4. Secuencias de los cebadores empleados para determinar el silenciamiento de la proteína TNF- α humana por RT-PCR cuantitativa.	77
Tabla 5. Secuencias de los RNAs de interferencia.	78
Tabla 6. Secuencias de las guías CRISPR empleadas para deleccionar la región del gen chPKR que codifica para el dominio de unión a dsRNA.	79
Tabla 7. Secuencias de los cebadores empleados para la caracterización genotípica de los clones CRISPR y para la secuenciación del plásmido MLM3636.	80

ABREVIATURAS

2-5A	2'-5' oligoadenilato	DED	dominio efector de muerte (<i>Death effector domain</i>)
aa	aminoácido	DEPC	dietil pirocarbonato
Amp^R	resistencia a ampicilina	DF-1	fibroblastos embrionarios
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating</i>	DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i>
ATCC	colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)	DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
ATP	adenosín trifosfato	DMSO	dimetilsulfóxido
ATF	<i>Activating transcription factors</i>	DNA	ácido desoxirribonucleico
BCA	ensayo colorimétrico de cuantificación proteica del ácido bicinconínico	dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	D.O.	densidad óptica
BEV	torovirus equino Berne virus	d p.i.	días post infección
BIR	<i>baculovirus IAP repeat</i>	d p.t.	días post transfección
BrEt	bromuro de etidio	dsRNA	RNA de doble cadena.
CARD	dominio de reclutamiento y activación de caspasas (<i>Caspase-recruitment domain</i>)	DT40	linfocitos B de pollo provenientes de un linfoma inducido en la bolsa de Fabricio mediante infección por el virus de la leucosis aviar (ALV)
cDNA	DNA complementario	DTT	ditiotreitol
CD4	linfocitos T que expresan el marcador CD4 (<i>cluster of differentiation 4</i>)	EBV	virus Epstein Barr
CD8	linfocitos T que expresan el marcador CD8 (<i>cluster of differentiation 8</i>)	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ch	pollo (<i>chicken</i>)	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
chS	suero fetal de pollo	eIF4G1	<i>eukaryotic translation initiation factor G1</i>
CpG	<i>cytosine phosphate guanine</i>	eIF2α	<i>eukaryotic initiation factor 2A</i>
FLIP	<i>FLICE-inhibitory proteins</i>	EMCV	virus de la encéfalo-miocarditis
CMV	citomegalovirus	FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
CPXV	virus de la viruela bovina	FCS	suero fetal bovino (<i>Fetal Calf Serum</i>)
CSFV	virus de la peste porcina clásica	FLIPs	<i>FADD-like interleukin-1β-converting enzyme inhibitory proteins</i>
C-terminal	carboxilo terminal	GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
DD	dominio de muerte (<i>Death domain</i>)	GAS	<i>Gamma activated sequence</i>
		GFP	proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
		h	horas
		HCV	virus de la hepatitis C

HeLa	línea celular humana procedente de un carcinoma cervical	MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signalling protein</i>
HIV-1	virus de la inmunodeficiencia humana	MCS	región de clonaje múltiple (<i>Multiple cloning site</i>)
h p.i.	horas post infección	MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
h p.t.	horas post transfección	Mock:	células no infectadas/no tratadas
HPRT1	hipoxantina fosforibosiltransferasa 1.	MOI	multiplicidad de infección
HVE-2	herpes virus equino 2	MPA	ácido micofenólico
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>	MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Bromuro de difeniltetrazolium
IAV	virus de la gripe A	MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
IBDV	virus de la bursitis infecciosa	mRNA	RNA mensajero
ICAD/DFF45	<i>Inhibitor of Caspase-activated deoxyribonuclease</i>	NCS	suero de ternera recién nacida (<i>Newborn calf serum</i>)
IFN	interferón	NDV-GFP	recombinante del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) que tiene clonado el ORF de la proteína GFP
IFNR	<i>Interferon-α/β receptor</i>	NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
IFNG	<i>Interferon-γ receptor</i>	NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
IκB	<i>inhibitor of kappa B</i>	NLS	secuencia de localización nuclear (<i>Nuclear localization sequence</i>)
IKK	<i>inhibitor of nuclear fraction kappa B kinase</i>	nt	nucleótido
IL	interleuquina	N-terminal	amino terminal
IPNV	virus de la necrosis pancreática	NK	células <i>natural killer</i>
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	OAS	<i>2'-5' oligoadenylate synthetase</i>
IRFs	<i>Interferon regulatory factors</i>	ORF	marco de lectura abierto (<i>Open reading frame</i>)
ISGs	<i>Interferon stimulate genes</i>	PACT	<i>PKR activating protein</i>
ISGF3	<i>IFN stimulated gene factor 3</i>	PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
ISRE	<i>IFN-stimulated response elements</i>	PARP-1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>	pb	pares de bases
Kb	kilobase		
kDa	kilodalton		
KSHV	herpesvirus asociados al sarcoma de Kaposi		
LacI	represor del operón lactosa		
LacO	operón lactosa		
LB	Medio de cultivo Luria Broth		
LCMV	virus de la coriomeningitis linfocitaria		
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>		

PBS	solución tamponada con fosfato	TBS	solución salina tamponada con Tris
PCR	reacción en cadena de polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)	TBS-T	solución salina tamponada con Tris conteniendo Tween 20
PBS	Solución de tampón fosfato	TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain</i>
PEG	polietilenglicol	TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
PKR	<i>Protein kinase RNA-dependent</i>	Tm	temperatura de fusión
Poly (I:C)	ácido poliinosínico/policitidílico	TNF-α	factor de necrosis tumoral α
PRRs	receptores de reconocimiento de patrones (<i>Pattern recognition receptors</i>)	TNFR	receptor del factor de necrosis del factor tumoral (<i>Tumor necrosis factor receptor</i>)
PRRSV	Arterivirus causante del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo.	TRADD	<i>TNFR1-associated death domain receptor</i>
qRT-PCR	PCR cuantitativa	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
RD	dominio represor (<i>repressor domain</i>)	TRAF3	<i>TNFR-associated factor 3</i>
RHD	<i>Rel homology domain</i>	TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene-1</i>	TRIM25	<i>tripartite motif-containing protein 25</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>	Tris	tri-(hidroximetil)-aminometano
RNA	ácido ribonucleico	TYK2	<i>tyrosin kinase 2</i>
RNasa L	Ribonucleasa L	UFP	unidades formadoras de placa
RNPs	complejos ribonucleoproteicos	UI	unidades internacionales
rpm	revoluciones por minuto	UTR	regiones no codificantes
rRNA	RNA ribosomal	UV	ultravioleta
RT-PCR	transcripción reversa seguida de PCR	VLPs	pseudopartículas virales (<i>virus like particles</i>)
rVV	recombinantes del virus vaccinia	VP	proteína viral (<i>viral protein</i>)
SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo	VSV	virus de la estomatitis vesicular.
SDS	dodecyl sulfato sódico	VV	virus vaccinia
SDS-PAGE	electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS	VV-LacOI	recombinante del virus vaccinia que expresa de forma inducible la polimerasa del fago T7 bajo la regulación del operón lacO de <i>E. coli</i> (VT7lacOI)
SFV	virus del bosque Semliki	WT	tipo silvestre (<i>Wild type</i>)
SLO	<i>stem-loop/lacO</i>		
ssRNA	RNA de cadena sencilla		
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>		
T	número de triangulación		
tBID	forma truncada del factor Bid		
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>		

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. VIRUS DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV)

IBDV pertenece al género *Avibirnavirus* dentro de la familia *Birnaviridae*, y junto con el virus de la necrosis pancreática (IPNV), el cual infecta a varias especies de vida acuática (1), constituyen los virus mejor estudiados de esta familia. Hay otros miembros de esta familia que infectan insectos (*Drosophila X virus*, DXV) y moluscos bivalvos (2).

Este virus es el agente causal de la bursitis infecciosa o enfermedad de Gumboro, la cual fue descrita por primera vez en los años 60 en Gumboro (Delaware, EUA) y actualmente se encuentra distribuida ampliamente a nivel global, teniendo gran relevancia económica en el sector avícola (3). La importancia de esta enfermedad ha llevado a incluirla en la lista de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos descrita por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2017/>).

1.1. ESTRUCTURA GENÓMICA DE IBDV

El virus IBDV presenta un genoma que consta de dos segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), uno de 3,2 kb (Segmento A) y otro de 2,8 kb (Segmento B), con

regiones no codificantes (UTR) relativamente cortas en los extremos 5' y 3' (Fig. 1).

El Segmento A presenta dos marcos de lectura abierta (ORF) que se encuentran parcialmente solapados. El primer ORF codifica la proteína no estructural VP5 (17kDa), la cual no es necesaria para la replicación del virus en cultivos celulares (4), pero resulta esencial en la transmisión célula a célula y para la patogenia (5). El segundo ORF, de mayor tamaño y monocistónico, codifica una poliproteína (110 kDa) que sufre un procesamiento autoproteolítico dando lugar a tres proteínas: el precursor de la proteína de la cápsida, pVP2 (512 aa, 54,4 kDa), cuyo procesamiento genera la proteína madura VP2 (47 kDa) (6), la proteasa viral responsable del procesamiento proteolítico, VP4 (244 aa, 27 kDa) y la proteína multifuncional, VP3 (256 aa, 29 kDa) (7).

El Segmento B codifica la polimerasa de RNA dependiente de RNA, VP1 (879 aa, 98kDa) (8), la cual se encuentra en forma de proteína libre o unida covalentemente al extremo 5' de ambos segmentos de RNA, denominada en esta forma como VPg (9). Al igual que otras polimerasas de virus dsRNA, la polimerasa de birnavirus cataliza tanto la replicación como la transcripción del genoma de IBDV

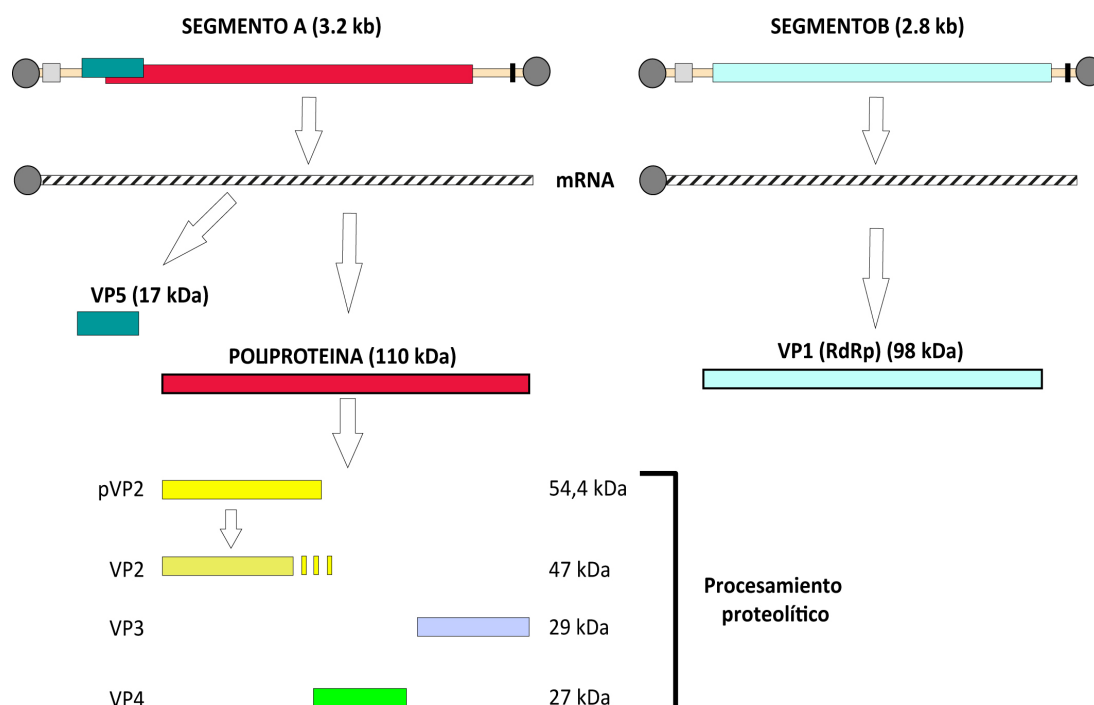


Figura 1. Organización genómica de IBDV. El segmento A presenta dos marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral, respectivamente. Esta última es procesada cotraduccionalmente por la proteasa viral, VP4, dando lugar a las proteínas pVP2, VP3 y VP4. El procesamiento de pVP2 da lugar a la proteína madura VP2. El segmento B contiene un único ORF que codifica la RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp), VP1.

(10). La guanilación de VP1 permite que esta actúe además como cebador para la polimerización de las nuevas cadenas del RNA viral. Este papel dual de la polimerasa es característico de virus de la Familia *Birnaviridae* (11).

1.2. VIRIÓN DE IBDV

Los viriones de IBDV son partículas icosaédricas desnudas, con un diámetro ~650-700 Å, y una única cápsida proteica (12) de simetría T=13, formada por 260 trímeros cuasiequivalentes de VP2 organizados en 12 pentámeros y 120 hexámeros (13). Mediante análisis bioquímicos se ha determinado que VP3 junto con VP2 son

las principales proteínas estructurales del virión de IBDV (1). VP3 actúa como proteína de andamiaje durante la morfogénesis de la cápsida, uniéndose al extremo C-terminal de pVP2 (13). Además, VP3 interacciona con VP1 (14) y con el genoma viral formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) (15), una característica única entre virus de dsRNA (Fig. 2). Estas proteínas se encuentran en una proporción constante, con 780 copias de VP2, 450 copias de VP3 y 12 copias de VP1 en cada partícula de IBDV (9). En preparaciones de virus obtenidas a partir de células infectadas, se han podido identificar hasta 6 poblaciones virales con cantidades crecientes del complemento

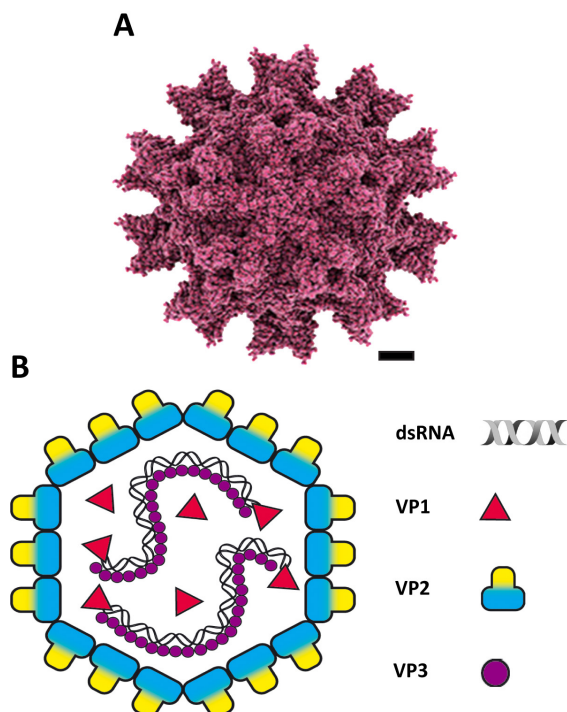


Figura 2. Virión de IBDV. A. Reconstrucción tridimensional de la partícula viral de IBDV obtenida de Science Photo Library. B. Representación gráfica de la estructura de IBDV. Se muestra un esquema de la cápsida viral formada por subunidades de VP2. En el interior se encuentran los complejos ribonucleoproteicos (RNPs) formados por el dsRNA, VP1 y VP3. La barra de escala corresponde a 10 nm.

genómico. Esto indica que una partícula de IBDV puede portar hasta 4 copias del genoma, aunque manteniendo la misma estequiometría proteica. Esta poliploidía en IBDV parece mejorar la propagación e infectividad respecto a partículas haploides (16).

Los virus de dsRNA suelen presentar una o varias cápsidas, y nunca liberan su genoma fuera de ellas. Estos virus presentan una cápsida central denominada *core*, con simetría T=2, que permanece intacta durante todo el ciclo viral, y es donde ocurre la replicación y la transcripción

del RNA genómico. El RNA mensajero resultante (mRNA) es extruido al citoplasma a través de canales presentes en este core (17, 18) para ser traducido por la maquinaria celular. Por otro lado, estas cápsidas especializadas juegan un papel importante evitando el reconocimiento de dsRNA por sensores celulares, e impidiendo así la activación de la respuesta innata por el genoma viral. Sin embargo, los miembros de la familia *Birnaviridae* carecen de esta estructura interna (19). Dalton y Rodríguez (20) comprobaron que la transfección de dsRNA viral en células que coexpresan las proteínas VP1 y VP3 da lugar a la producción de partículas infectivas de IBDV. Estos resultados demuestran que los complejos RNPs son suficientes para que la replicación viral tenga lugar correctamente en ausencia de la cápsida. Además, indican que estas estructuras, las RNPs, actúan como unidades transcripcionales, en las que el RNA genómico estaría protegido frente a los sensores celulares. Imágenes de microscopía electrónica de complejos RNPs de IBDV así como de IPNV han demostrado consistentemente que sus genomas se encuentran completamente cubiertos por moléculas de VP3 (9, 15). Por otra parte, estudios llevados a cabo con proteína recombinante producida en células de insecto, demuestran que la proteína VP3 de IBDV se une de manera eficiente y no específica a dsRNA (21). Esto sugiere que al igual que otras proteínas de unión a dsRNA, como por ejemplo la proteína NS1 del virus de la gripe (22) o E3 del virus vaccinia (VV) (23), VP3 podría actuar enmascarando el dsRNA viral frente a los sensores celulares,

evitando la activación de la respuesta inmune antiviral por parte del hospedador.

VP3 es una proteína multifuncional, ya que además de su función como proteína de andamiaje, y de su unión al genoma viral formando los complejos RNPs, es capaz de reclutar moléculas de VP1 al interior de la cápsida (24) y de actuar como activador de la misma. La activación de la polimerasa se produce a través de una interacción con el extremo C-terminal de VP3, que origina un cambio conformacional, desbloqueando el sitio activo de VP1 (25).

1.3. CICLO DE VIDA DE IBDV

La fase temprana del ciclo de vida de IBDV consiste en una primera etapa de adhesión celular a través de la interacción entre VP2 y la integrina $\alpha 4\beta 1$ (26), gracias al dominio de unión a integrina presente en VP2. No obstante, se han sugerido otros posibles receptores que median la adhesión celular, como la proteína de choque térmico 90 (cHSP90 α) (27). A continuación, el virus entra al interior celular por la vía endocítica (28), por lo que queda internalizado en vesículas endosomales. Estos compartimentos intracelulares presentan una baja concentración de calcio (29), lo que propicia la desestabilización de la partícula viral. Se ha descrito que la presencia de calcio es necesaria para mantener la estabilidad de la cápsida viral, tanto entre las subunidades de VP2 que constituyen los trímeros, como entre los trímeros (30), por lo que una falta de calcio llevaría a la desencapsidación del virus. Este evento provoca la liberación de

un péptido denominado pep 46, el cual es producido durante la maduración de VP2 (31). Galloux y colaboradores (32) han descrito que este péptido es capaz de perforar la membrana endosomal, conduciendo a la formación de poros y abriendo camino hacia el citoplasma desde el lumen endosomal, donde los complejos RNPs son liberados. No obstante, los procesos como la replicación/transcripción del RNA, síntesis proteica y ensamblaje de las partículas víricas se llevan a cabo en asociación con la cara citoplasmática de la membrana endosomal (33). Otros virus de dsRNA como los rotavirus, comparten similitudes con IBDV en el proceso de entrada. Estos virus también entran al interior celular a través de la ruta endocítica, seguido de su liberación desde las vesículas endosomales por proteínas de perforación de membrana (34).

Por otro lado, el mecanismo de salida de la progenie viral ha sido descrito recientemente (35). IBDV emplea dos mecanismos para su salida de la célula. El primero de ellos, es un mecanismo del tipo no lítico, dependiente de la proteína viral VP5, que ocurre durante la fase temprana del ciclo de vida de IBDV. Imágenes tomadas por microscopía electrónica de transmisión, muestran la formación de vesículas de membrana simple con partículas virales de nueva síntesis en su interior. La aparición de estas estructuras membranosas parece que facilita la liberación de las partículas virales desde células con una membrana plasmática aparentemente intacta. Se ha sugerido que para ello el virus podría servirse de las rutas

celulares de formación de cuerpos multivesiculares o de autofagia, consiguiendo la liberación de la progenie viral. El segundo mecanismo es independiente del primero, e implica la lisis celular durante la fase tardía del ciclo viral. Todo ello caracterizado por una drástica reducción metabólica del virus, acompañada de un evidente efecto citopático y muerte celular. Además, se ha descrito que IBDV forma estructuras paracristalinas en el interior celular, las cuales son altamente estables y pueden llegar a estar formadas por miles de partículas virales perfectamente ordenadas. Su importancia biológica aún permanece inexplorada, pero se ha relacionado con la transmisión horizontal a largo plazo, gracias a la gran estabilidad de estas superestructuras.

1.4. PATOGENIA

IBDV es el agente etiológico de la enfermedad de la bursitis infecciosa, una enfermedad aguda y altamente contagiosa que afecta a las formas juveniles de la gallina doméstica (*Gallus gallus*) (2). Los linfocitos B inmaduros son las principales células diana de IBDV, aunque el virus es capaz de infectar activamente macrófagos y monocitos. Estos linfocitos maduran y se diferencian en un órgano linfoide denominado bolsa de Fabricio, el cual se encuentra únicamente en aves. La enfermedad también afecta a otros órganos linfoides, como el timo, u órganos hematopoyéticos, como el bazo y la médula ósea (36). La infección por IBDV conduce a un estado de inmunosupresión debido a la muerte de los linfocitos B inmaduros en la bolsa de Fabricio. Esto

aumenta significativamente la susceptibilidad a otros patógenos oportunistas, llevando en muchos casos a la muerte de los animales infectados (37). Por otra parte, produce una reducción de la eficacia de las vacunas frente a otros patógenos, como los virus de la enfermedad de Newcastle, la enfermedad de Marek o la bronquitis infecciosa (2, 38). Debido a la alta mortalidad de los animales infectados, esta enfermedad es responsable de grandes pérdidas económicas en el sector avícola a nivel mundial (39).

IBDV es un virus de naturaleza muy estable, por lo que presenta una alta resistencia a las condiciones ambientales, incluso después de etapas descontaminación (40). Posiblemente esto se deba a la formación de las estructuras paracristalinas previamente mencionadas, lo que hace difícil su completa eliminación de lugares considerados como focos de infección. Por ello, la vacunación es imprescindible para el control de este virus. Respecto a este tema, empleando vacunas vivas atenuadas se ha conseguido la inducción de anticuerpos neutralizantes que confieren una amplia protección. No obstante, este sistema de vacunación implica un alto riesgo debido a la posibilidad de reversión y la aparición de cepas virulentas (2), lo que se ha relacionado con la rápida diseminación global de la enfermedad (41). Otro problema añadido es la presencia de anticuerpos maternos en los pollos jóvenes. Estos confieren protección durante algún tiempo, pero esta protección no es duradera, y puede interferir con la vacunación, complicando

por tanto la elección del momento adecuado de la vacunación (42, 43). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el control de esta enfermedad.

La gravedad de la enfermedad depende de varios factores, como son la virulencia del virus, la edad del animal y la variedad de pollo. Respecto al primer factor, se han descrito dos serotipos para IBDV en función de la secuencia que presenta VP2 en la denominada región variable de esta proteína. Los virus que constituyen el serotipo I son los responsables de la enfermedad, pero difieren ampliamente en el grado de virulencia. Estos virus se pueden dividir entre aquellos que producen lesiones significativas en la bolsa de Fabricio, pero que no suelen causar muerte, y aquellos que producen una gran mortalidad, como el virus del subtipo clásico (*classical virulent*, cvIBDV) o muy virulento (*very virulent IBDV*, vvIBDV). Por otro lado, los virus del serotipo II no son patogénicos en pollos domésticos (2, 3).

Por otro lado, la sintomatología causada por IBDV es muy dependiente de la edad de los animales. Los pollos de 3-6 semanas de vida son más susceptibles a la infección, y en ellos se manifiesta claramente la enfermedad, sin embargo, en aves de mayor edad la infección se mantiene de manera subclínica. Esto se debe a que durante la etapa de 3-6 semanas de vida se alcanza un máximo grado de desarrollo de la bolsa de Fabricio, lo cual se relaciona directamente con el momento de producción de linfocitos B. Estos linfocitos se encuentran

en un estado inmaduro y metabólicamente activo, caracterizado por la expresión de la inmunoglobulina M (3, 44). El periodo de incubación de la enfermedad es muy corto (2-3 días), siendo menor para infecciones con virus del subtipo vvIBDV (60 horas). La fase aguda se caracteriza por la presencia de síntomas clínicos muy graves, como un alto grado de deshidratación, hemorragia muscular e intensas diarreas, todo ello acompañado de una gran mortalidad. El pico de mortalidad se alcanza entre los 3-4 días post infección (d p.i.), y a partir de entonces el índice de mortalidad disminuye, y las aves supervivientes manifiestan un estado aparente de buena salud a los 5-7 d p.i. (3), quedando muchas de ellas como portadoras de IBDV.

El virus se transmite por vía fecal-oral o por inhalación, y llega hasta la bolsa de Fabricio a través de linfocitos B y macrófagos infectados, asociados a tejidos del intestino (2). Se ha señalado la importancia de la infección de monocitos y macrófagos en la diseminación del virus (45), contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. Una vez en la bolsa de Fabricio, IBDV se replica activamente en linfocitos B inmaduros, los cuales mueren principalmente por apoptosis durante la infección (3). La muerte de los linfocitos B induce la infiltración de linfocitos T, los cuales no son susceptibles a la infección por IBDV, y la activación de los macrófagos en la bolsa. Todo ello lleva a la expresión de diferentes tipos de interleuquinas (IL) e IFN- γ por parte de las células T. El IFN- γ secretado contribuye aún más a la

activación de los macrófagos, conduciendo a la producción de factores proinflamatorios como óxido nítrico y otras citoquinas como IL-6. Como consecuencia de todo ello, se produce una tormenta de citoquinas y una activación desmesurada de la respuesta inmune (46, 47), contribuyendo a la destrucción tisular durante la fase aguda de la infección (48). Además, se ha relacionado la exacerbada expresión de IFN- γ con el agravamiento de la sintomatología de la enfermedad, y la consiguiente inmunosupresión por pérdida de células bursales (47).

Sin embargo, las bases moleculares de la patogenia inducida por IBDV permanecen prácticamente inexploradas. No obstante, existen muchos estudios que señalan el papel del proceso apoptótico como causante de la patogenia desencadenada por IBDV. La muerte por apoptosis ha sido descrita tanto *in vivo*, en esplenocitos, timocitos y células bursales provenientes de pollos o embriones infectados (49-52), como *in vitro*, en linfocitos del sistema circulatorio periférico (53) y en cultivos celulares, como fibroblastos embrionarios de pollo (54), linfocitos B (55) y células Vero (53). Incluso, se ha descrito que el virus es capaz de inducir apoptosis en células bursales y timocitos que no han sido infectados, lo que contribuye a la rápida pérdida de linfocitos B y a la destrucción de la bolsa de Fabricio, conduciendo a un estado de inmunosupresión. Todo lo anteriormente expuesto sustenta la idea de que la inmunidad innata desempeña un papel fundamental en la patogenia inducida por IBDV.

2. INMUNIDAD INNATA DEL HOSPEDADOR

La respuesta innata desempeña un papel crítico en las etapas iniciales de la infección viral, al igual que en la iniciación y progresión de la respuesta adaptativa. Las diferentes etapas del ciclo viral son capaces de estimular los mecanismos de defensa del hospedador, como la inducción de apoptosis o la producción de interferón.

2.1. APOPTOSIS

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada, la cual se describe como un proceso genéticamente codificado que se activa en respuesta a una variedad de estímulos, y que desencadena una serie de rutas intracelulares. Este tipo de muerte celular, altamente conservado en organismos multicelulares, desempeña importantes funciones a nivel biológico. La apoptosis está implicada en procesos de desarrollo, diferenciación, proliferación, eliminación de células que han sufrido daño genético o células cancerosas. Además, actúa previniendo la replicación viral (56, 57), evitando la propagación del virus.

A nivel morfológico, las células que mueren por apoptosis presentan una serie de características que las diferencian de aquellas que experimentan una muerte por necrosis. Las células apoptóticas sufren una contracción y deformación celular, separándose de sus células vecinas, y provocando evaginaciones de la membrana plasmática. Además, se produce una condensación de la cromatina, y la formación de cuerpos apoptóticos. Estas estructuras

membranas constituidas por citosol, organelas y fragmentos nucleares en su interior, normalmente son fagocitados para no inducir la respuesta inflamatoria. En cambio, la necrosis provoca un aumento en el tamaño celular y el contenido celular es vertido de manera incontrolada sobre las células vecinas, lo que origina una fuerte respuesta inflamatoria (58)

2.1.1. Caspasas

La apoptosis es un proceso que requiere la participación de muchas proteínas. Entre las más influyentes en el proceso se encuentran las caspasas. Estas proteínas pertenecen a una familia de proteasas altamente conservadas y dependientes de cisteína. De manera habitual, se encuentran en estado latente en forma de zimógenos inactivos o procaspasas. Además, presentan especificidad de sustrato, ya que cortan después de un residuo de ácido aspártico en motivos formados por tetrapéptidos cortos (X-X-X-Asp) (59). Estas proteínas presentan 3 dominios en común, un dominio de muerte en su extremo N-terminal (DD), un dominio efector de muerte como centro activo (DED) y un dominio de reclutamiento de caspasas en su extremo C-terminal (CARD). Tras su activación mediante interacción con otras procaspasas o con un cofactor, o mediante procesamiento proteolítico, se forman proteasas heterotetraméricas activas, que inician el proceso de apoptosis (60).

Las caspasas pueden ser clasificadas en tres grupos en función de sus estructuras y su función (56):

a) Aquellas que cumplen funciones en la maduración de citoquinas, como IL-1 β e IL-18, y en procesos inflamatorios. Estas son denominadas caspasas inflamatorias e incluyen las caspasas 1, 4 y 5. Aunque no intervienen directamente en la inducción de apoptosis, estas proteínas son clave en la respuesta inmune tras la infección por patógenos microbianos.

b) Un segundo grupo formado por las denominadas caspasas iniciadoras, las cuales presentan el dominio CARD (caspasa 2 y 9) o el dominio DED (caspasa 8 y 10).

c) Y un tercer grupo formado por las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7).

Otras caspasas como la 12, 13 y 14 no han sido categorizadas, pero se ha comprobado su papel en el procesamiento de citoquinas.

Como resultado de la inducción de la apoptosis, las caspasas cortan una variedad de sustratos. Entre ellos se encuentra el inhibidor ICAD/DFF45, que al ser degradado conduce al corte del DNA genómico por la nucleasa CAD. El corte de la proteína gelsolina genera fragmentos que cortan los filamentos de actina de manera descontrolada. En esta misma línea, otros sustratos son las proteínas PARP-1 (*poly (ADP-ribose) polymerase-1*) y eIF4G1 (*eukaryotic translation initiation factor G1*), que son considerados como marcadores moleculares de la apoptosis. PARP-1 es una proteína de unión a DNA que transfiere polímeros de ADP ribosa a proteínas involucradas en la arquitectura de la cromatina y el metabolismo de DNA. PARP es susceptible al corte por las

caspasas 3 y 7 durante la apoptosis, lo que lleva a la ausencia de la reparación de DNA (61). Por su parte, eIF4G1 tiene un papel clave durante la traducción, y en la unión del RNA mensajero al ribosoma, por lo que su degradación conduce a la inhibición de la síntesis proteica (62, 63).

2.1.2. Rutas apoptóticas

La activación de las caspasas puede ocurrir a través de dos rutas de señalización diferentes, pero interrelacionadas, en función del tipo de estímulo. Estímulos extracelulares inducen la ruta dependiente de receptores o extrínseca. Por otro lado, un estímulo intracelular como el daño del DNA, dispara la activación de la ruta mitocondrial o intrínseca, desencadenada principalmente por señales que inducen la fuga de citocromo c desde la mitocondria. En la Figura 3 se presenta un esquema de ambas rutas apoptóticas.

2.1.2.1. Ruta extrínseca

Esta ruta es iniciada cuando los ligandos de muerte que pertenecen a la superfamilia de proteínas TNF (factor de necrosis tumoral): FasL/CD95L, TNF- α y TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) se unen de forma específica a sus receptores de muerte en la superficie celular: Fas/CD95, TNFR y DR4 o DR5, respectivamente. Estas proteínas presentan dominios extracelulares ricos en cisteína, así como dominios de muerte (DD) en su extremo C-terminal. A través de estos últimos reclutan a proteínas adaptadoras, como FADD y TRADD, gracias a que también presentan dominios DD. Además, estas proteínas adaptadoras

presentan un dominio DED en su extremo N-terminal, lo que permite el reclutamiento de la procaspasa 8, la principal de esta ruta, a través de interacciones DED-DED formando el complejo DISC (*death-inducing signaling complex*). Todo ello conduce a la activación de la caspasa 8 y, su liberación del complejo DISC inicia la cascada de activación (64-66).

2.1.2.2. Ruta intrínseca

Esta ruta responde a señales de muerte originadas en el interior celular, las cuales se integran y se propagan a través de la mitocondria. Esto conduce a la pérdida del potencial de membrana y a la liberación del citocromo c. Este se une a una proteína llamada Apaf-1 y, a través de su dominio CARD, se asocia con la procaspasa 9 formando un complejo denominado apoptosoma (67). Este evento dispara la activación de la caspasa 9, e inicia la cascada apoptótica culminando en la producción de apoptosis por la activación de las caspasas efectoras.

Las rutas extrínseca e intrínseca se encuentran interconectadas a través de la proteína pro-apoptótica Bid, ya que la caspasa 8 corta el extremo C-terminal del dominio BH3 de esta proteína. Ello genera una forma truncada de Bid (t-Bid), provocando su translocación a la membrana externa mitocondrial (68), y la activación de la ruta intrínseca.

2.1.3. Regulación de la apoptosis

La activación de las caspasas está estrictamente regulada, ya que la proteólisis es un proceso

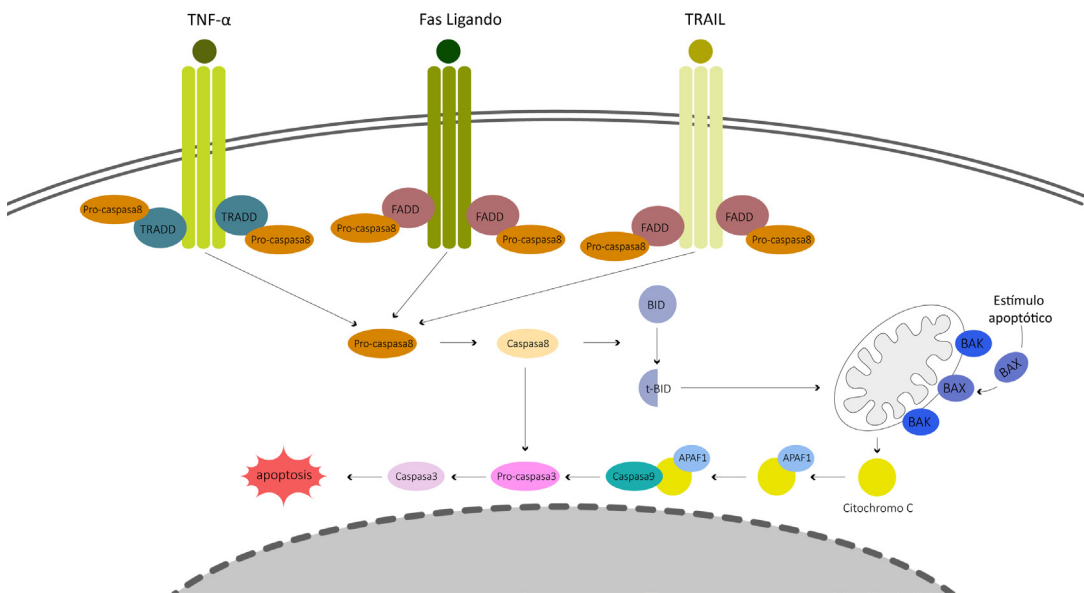


Figura 3. Esquema de las rutas apoptóticas. La unión de los ligandos de muerte (TNF- α , FasL y TRAIL) a sus receptores activa la ruta extrínseca de la apoptosis. Estos transmiten la señal apoptótica a través de sus dominios DD a las moléculas adaptadoras TRADD y FADD y activan a la caspasa 8. La activación de la ruta intrínseca o mitocondrial, a través de estímulos externos o daños en la célula, conduce la activación de los factores pro-apoptóticos Bax y Bak promoviendo la salida del citocromo c y la formación del apoptosoma. Ambas rutas se encuentran interconectadas a través de la proteína pro-apoptótica Bid e inducen finalmente la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7.

irreversible y las caspasas tienen el potencial de amplificar la activación de caspasas mediante una cascada proteolítica. Por ello, esta regulación se lleva a cabo a diferentes niveles:

a) La familia de proteínas celulares denominadas proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), las cuales presentan un dominio BIR (*baculoviral IAP repeat*), son capaces de inhibir directamente la activación de las caspasas efectoras (69). Además, la sobreexpresión de este grupo de proteínas inhibe la apoptosis inducida por miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2.

b) La familia de proteínas Bcl-2 está formada por miembros pro- (Bax, Bak y Bid)

y anti-apoptóticos (Bcl-2 y Bcl-XL). Su nombre deriva del primer factor identificado en la formación de linfomas de células B. Todos los miembros de esta familia presentan al menos un dominio de los 4 característicos de este grupo de proteínas (BH1-BH4).

Los miembros anti-apoptóticos presentan todos los dominios, mientras que Bax y Bak solo presentan los dominios BH1-BH3, y la proteína Bid solo el dominio BH3. Estas proteínas pueden funcionar de manera independiente o de forma conjunta en la regulación de la apoptosis. Las proteínas anti-apoptóticas suelen encontrarse asociadas a membrana, como en la mitocondria, manteniendo de esta forma su integridad. No obstante, cuando llega una señal

apoptótica, las proteínas pro-apoptóticas que se encuentran en el citoplasma, cambian de conformación y se integran en la cara externa de la membrana mitocondrial, neutralizando a los miembros anti-apoptóticos (62, 70). Estas interacciones son posibles gracias a que tienen la capacidad de formar homo- y heterodímeros entre ellas. De esta forma, existe una competencia entre ambos tipos (71), pudiendo bloquearse unos a otros, y el balance entre ellas determinará si la célula entra o no en apoptosis.

c) Las proteínas FLIP celulares (*FLICE-inhibitory proteins*) son moléculas altamente conservadas en vertebrados, y son capaces de interferir en la señalización apoptótica a través de sus dominios DED. Se han encontrado tres isoformas de diferentes tamaños denominadas FLIP_S, FLIP_R y FLIP_L (64), presentando la de mayor tamaño, FLIP_L, una alta homología con la procaspasa 8. No obstante, el dominio parecido a caspasa que presenta en su extremo C-terminal no tiene actividad proteolítica. Todas las isoformas pueden formar heterodímeros con la procaspasa 8 a través de la interacción de sus dominios DED. FLIP regula principalmente la ruta apoptótica dependiente de receptor, aunque se ha determinado su importancia en otras rutas de muerte celular como la necrosis. Algunos virus codifican proteínas similares anti-apoptóticas para prevenir la muerte celular. Ejemplos de ello son la proteína K13 del herpesvirus asociados al sarcoma de Kaposi (KSHV) (72) o la proteína E8 del herpesvirus equino (HVE-2) (73). Se ha propuesto que los genes que codifican

estas proteínas derivan de genes de la célula huésped, ya que presentan una alta homología con el extremo N-terminal de la procaspasa 8.

2.2. RUTA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR IFN

Las células de los animales vertebrados detectan antígenos virales o PAMP (*pathogen associate molecular patterns*) a través de receptores de reconocimiento o PRR (*pattern recognition receptor*). A través de ellos se produce la activación de una serie de factores transcripcionales, y la expresión de genes de la respuesta innata antiviral, como el interferón (IFN). Esta citoquina tiene un papel clave como primera línea de defensa contra las infecciones virales.

Muchas células del sistema inmune innato como las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos, y células no inmunes como las células endoteliales y los fibroblastos presentan PRRs. Estos receptores pueden dividirse en dos grandes grupos. El primero de ellos está formado por miembros de los receptores TLR (*Toll-like receptor*). Estas proteínas se encuentran asociadas a membranas en la superficie celular y en compartimentos intracelulares, mediando el reconocimiento de ácidos nucleicos y glicoproteínas. El segundo gran grupo está formado por sensores citoplasmáticos del grupo RLR (*retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors*), y al igual que el grupo anterior, participan en el reconocimiento de material genético foráneo. Ambas rutas se esquematizan de forma simplificada en la Figura 4.

2.2.1. Receptores transmembranales TLR

Las proteínas TLR pertenecen al grupo I de proteínas transmembranales. Entre los TLR de mamíferos, TLR3, 7, 8 y 9 están involucrados en el reconocimiento de ácidos nucleicos de origen viral (74). Estas proteínas presentan un dominio extracelular caracterizado por repeticiones ricas en residuos de leucina, a través del cual reconocen a los PAMPs, un dominio transmembranal y un dominio intracelular TIR (*Toll-interleukin 1(IL-1) receptor*). A través de este dominio interactúan con otros motivos TIR de moléculas adaptadoras como TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*) para el caso de TLR3, o MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) para TLR7, 8 y 9. Todo ello conduce a la transducción de la señal, consiguiendo la activación de una serie de factores de transcripción como NF- κ B, IRF-3, IRF-7 y ATF-2, y finalizando en la producción de proteínas antivirales como IFN y citoquinas proinflamatorias (75).

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 10 TLR humanos, 14 TLR murinos y 10 TLR de pollo (chTLR) (76). Las proteínas TLR3, 7, 8 y 9 están localizadas exclusivamente en compartimentos intracelulares como el retículo endoplásmico, endosomas y lisosomas. TLR3 reconoce el dsRNA producido durante la replicación y transcripción del genoma viral. Por su lado, TLR7 y 8 reconocen ssRNA, mientras que TLR9 reconoce motivos no metilados CpG (*cytosine phosphate guanine*) del DNA viral. La proteína chTLR3 presenta un perfil de expresión celular parecido al encontrado en mamíferos (77) y se ha

demostrado su función en la respuesta inmune innata tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque la ruta de transducción de señales permanece de momento inexplorada. TLR7 también ha sido identificado en aves (78), mientras que TLR8 se presenta como un pseudogen y TLR9 ha sido deletado del genoma de aves (76). En lugar de este último, las aves presentan TLR15, que realiza una función parecida, pero no se tiene información acerca de su localización, ni de posibles agonistas. En humanos, TLR7 se expresa específicamente en células dendríticas plasmocitoides, y se ha visto que la expresión de chTLR7 está restringida a tejidos del sistema inmune.

2.2.2. Sensores citoplasmáticos RLR

La familia de los sensores citoplasmáticos RLR está constituida por tres miembros: RIG-I, MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) y LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) (79). RIG-I y MDA5 presentan dos dominios CARD en su extremo N-terminal, un dominio helicasa DEX (D/H), y uno de unión a RNA en su extremo C-terminal. LGP2 presenta los mismos dominios, a excepción de los dominios CARD. Se ha descrito un dominio represor en el extremo C-terminal de LGP2 y de RIG-I, a través del cual LGP2 regula negativamente a RIG-I. Por otro lado, RIG-I requiere para su activación la ubiquitinización de uno de sus dominios CARD por parte de la proteína TRIM25 (80). RIG-I es activada por moléculas cortas de dsRNA, generalmente menores a 1 kb, y RNA de cadena simple (ssRNA) que presenten extremos 5' trifosfatos producidos por las polimerasas virales, mientras que MDA5 reconoce

dsRNA de mayor tamaño y ssRNAs, tanto de polaridad positiva como de polaridad negativa.

A diferencia de patos y gansos, los pollos no presentan RIG-I (76), por lo que MDA5 es el principal sensor citoplasmático en pollos. A pesar de ello, se ha demostrado que chMDA5 compensa funcionalmente la ausencia de RIG-I, ya que induce eficientemente la producción de IFN tipo I tras el reconocimiento del genoma del virus IAV (*influenza A virus*), el cual es reconocido en mamíferos por RIG-I (81). Al igual que la proteína LGP2 de mamíferos, chLGP2 regula negativamente la inducción de la respuesta inmune innata. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio (82), señalan que chMDA5 interacciona con chTRIM25, aunque de momento no se sabe si la funcionalidad de chMDA5 requiere de dicha interacción, como es el caso de RIG-I en mamíferos.

Tras la activación de los sensores citoplasmáticos, estos se multimerizan y su dominios CARD interactúan con el dominio CARD de la molécula adaptadora mitocondrial MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*) (83). Esto conduce al reclutamiento de dos proteínas adaptadoras, TRAF3 (*TNFR-associated factor 3*) y NEMO (*NF- κ B essential modulator*), las cuales conectan y regulan la ruta a través de las quinasas TBK-1 (*TANK-binding kinase 1*) e IKK- ϵ (*inhibitor of nuclear fraction kappa B kinase subunit epsilon*). Estas dos quinasas son las responsables de la fosforilación de los factores de transcripción IRF-3/7 (*IFN regulatory factor 3/7*), dando lugar a su dimerización

y translocación al núcleo. Estas proteínas se unen a la región promotora de genes de IFN tipo I, lo que lleva a su inducción (84).

2.2.3. Tipos de IFN

La molécula de IFN se describió por primera vez en 1957 en células de pollo. El sistema de IFN incluye células que sintetizan IFN en respuesta a un estímulo externo, como una infección viral, y células que responden a IFN induciendo un estado antiviral. Estas citoquinas también participan en otros procesos como la regulación del crecimiento celular, la regulación génica, la diferenciación y la apoptosis. En general, el sistema de IFN de pollos es bastante similar al de mamíferos. La familia formada por estas citoquinas se divide en tres grupos. El IFN tipo I incluye principalmente a los IFN- α/β , expresados en la mayoría de las células e inducidos por las infecciones virales, razón por la que se los denomina “IFN viral”. Por otro lado, el IFN tipo II, conocido como “IFN inmune”, está constituido únicamente por IFN- γ , y solo células NK (*natural killer*) y linfocitos T CD4 y CD8 son capaces de producir este tipo de IFN. Por último, los IFN tipo III incluyen los IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3, los cuales siguen la misma ruta de señalización que los IFN tipo I, y también se inducen como respuesta a una infección viral (85). Este tipo de IFN se encuentra exclusivamente en tejidos epiteliales, como consecuencia de la expresión restringida de su receptor (86).

Los IFNs tipo I se unen a su receptor formado por las subunidades IFNAR1 y IFNAR2 (*IFN- α/β*

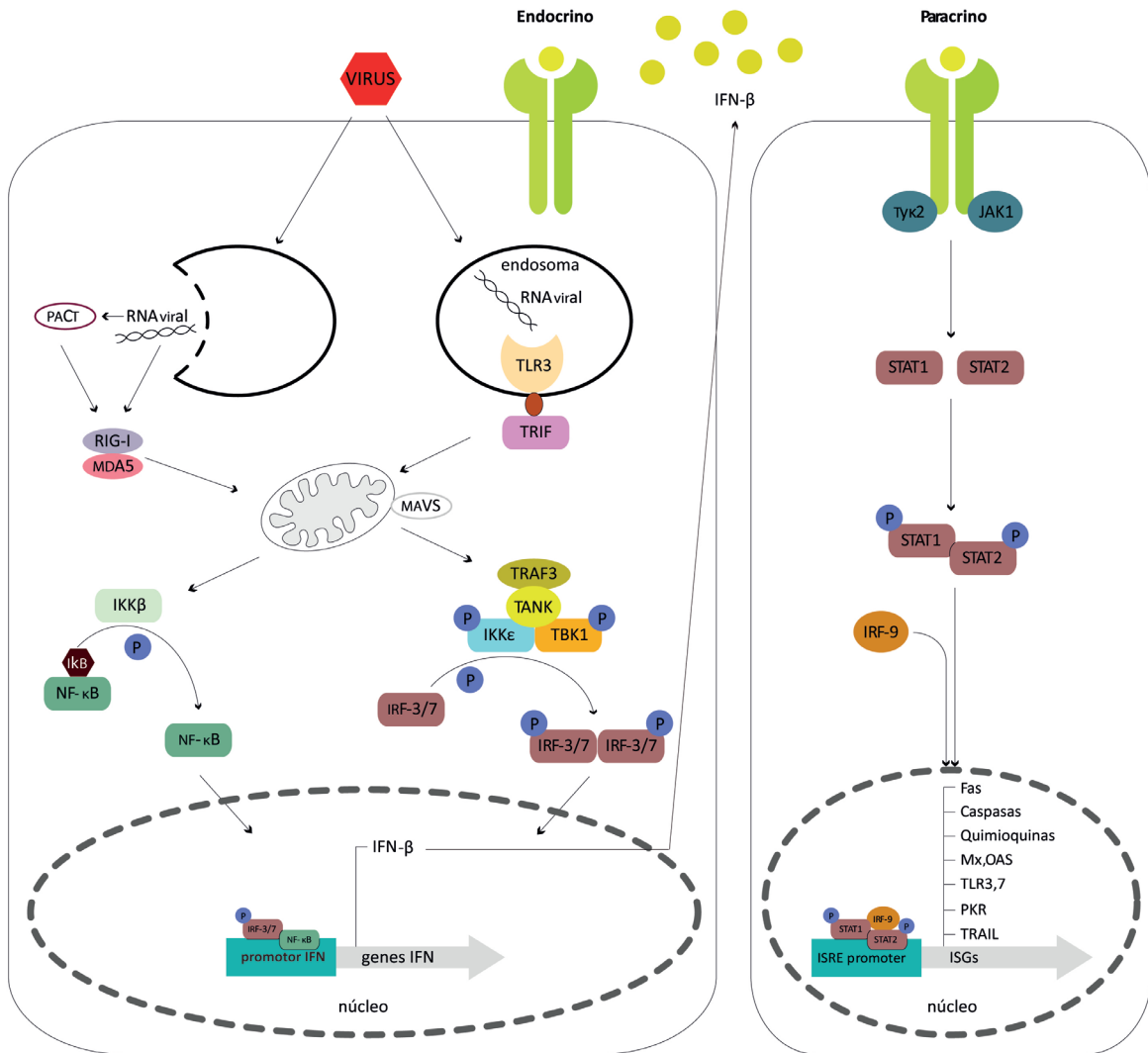


Figura 4. Esquema de la ruta de señalización de IFN tipo I. El dsRNA viral puede ser reconocido por receptores citoplasmáticos de la familia RLR como MDA5 y RIG-I o por parte de receptores celulares de la familia TLR. Ambas vías convergen en la activación de factores transcripcionales como IRF3/7 y NF-κB, uniéndose a la región promotora de IFN para inducir su expresión. El IFN secretado se une a su receptor y activa la ruta JAK/STAT para inducir la expresión de genes (ISGs) cuyos productos están implicados en la respuesta antiviral o en la apoptosis.

receptor), induciendo su dimerización, lo que lleva al reclutamiento de las proteínas tirosín quinasas JAK1 (*Janus kinase*) y TYK2 (*tyrosin kinase* 2). Ambas fosforilan y activan a los factores de transcripción STAT1 y STAT2 (*signal transducer and activator of transcription*), formando entre ellos heterodímeros, que al

unirse a IRF-9 forman un complejo denominado ISGF3 (*IFN stimulated gene factor 3*). Este complejo se transloca al núcleo y se une a la región promotora de genes inducibles por IFN (*ISG, interferon stimulated genes*) a través de motivos de unión a DNA denominados ISRE (*IFN stimulated response elements*),

activando de esta manera su transcripción. Por su lado, IFN- γ se une a un receptor distinto, formado también por dos subunidades, IFNGR1 y IFNGR2 (*IFN- γ receptor*). Esta unión induce la fosforilación de STAT1 por activación de las JAKs (JAK 1 y 2), formando un homodímero de STAT1 que se transloca al núcleo, y se une a secuencias promotoras de genes activados por IFN- γ , denominadas GAS (*gamma activated sequence*).

La producción de ISGs brinda un amplio efecto antiviral en células estimuladas por IFN. Entre las ISGs destacan las proteínas PKR, OAS (*the 2'-5' oligoadenylate synthetase*), la GTPasa Mx e IRF-1. Las proteínas PKR y OAS, que han sido ampliamente caracterizadas, se describen en el siguiente apartado. Mx es una proteína con actividad GTPasa, imprescindible para su acción antiviral (87). Interacciona a través de su región central y C-terminal con complejos virales, lo que produce la inhibición de la replicación viral. Esta proteína es inducible preferiblemente por IFN tipo I en mamíferos, aunque en aves Mx es menos restrictiva en la respuesta a diferentes tipos de IFN (88). Por su parte, IRF-1 es un factor de transcripción inducido por IFN- γ , capaz de unirse a regiones promotoras ISRE y promover la inducción de IFN- β . Este factor se encuentra regulado positivamente por NF- κ B. La gran mayoría de ISGs están conservadas en pollos y desempeñan funciones similares a las proteínas homólogas de mamíferos, a excepción de ISG-15, la cual no se encuentra en aves (89).

A pesar de la inducción de este estado antiviral, muchos virus escapan a los efectos del IFN. Por

ejemplo, la proteína no estructural del virus de la gripe NS1 secuestra el dsRNA impidiendo la activación de la PKR (90). Además, se ha visto que NS1 interacciona directamente con TRIM25, previniendo la activación de RIG-I (91). El virus VV codifica dos proteínas, E3 y K3, que previenen la actividad de la proteína PKR. E3 actúa secuestrando el dsRNA, mientras que K3 actúa como un pseudo inhibidor de PKR (92). Por su parte, se ha descrito que la proteína VP3 de IBDV juega un papel importante en la modulación de la respuesta antiviral del hospedador frente a IBDV, siendo capaz de bloquear la inducción de la expresión de IFN (93), y la actividad de PKR (91).

2.3. IFN Y APOPTOSIS

Claramente IFN puede prevenir la infección de una gran variedad de virus sin dañar a la célula. Sin embargo, la producción de estas citoquinas también puede promover la muerte celular a través de la inducción de apoptosis vía FADD/caspas 8 (56). De esta forma, el IFN es capaz de actuar de forma paracrina promoviendo la supervivencia de células no infectadas, llevándolas a un estado antiviral, pero también de forma autocrina, promoviendo la apoptosis en células infectadas, evitando de esta forma la diseminación del virus.

Se ha visto que determinadas ISGs pueden inducir un estado apoptótico. Por ejemplo, la PKR, cuya fosforilación en presencia de dsRNA viral puede llevar a la activación de factores transcripcionales como NF- κ B, que pueden promover la muerte celular.

a) La proteína PKR es una serín-treonín quinasa que se encuentra predominantemente en el citoplasma en muchos tipos celulares en forma latente (94). Su interacción con dsRNA a través de dos dominios en su extremo N-terminal modifica su conformación, permitiendo su activación por autofosforilación. Aunque también puede ser activada en ausencia de dsRNA por el activador proteico PACT (*PKR activating protein*) (95). Esta quinasa presenta varios sustratos, entre los que se encuentran el factor eucariótico de iniciación de la traducción, eIF2 α , y el inhibidor de NF- κ B, I κ B (56), siendo eIF2 α el sustrato de PKR mejor caracterizado. La fosforilación de este sustrato conduce a la inhibición de la síntesis proteica. Se ha descrito a PKR como una proteína pro-apotótica, siendo mediadora de la activación de la apoptosis inducida por dsRNA viral, a través de la fosforilación de eIF2 α , y de la activación de NF- κ B. También se ha señalado la inducción de apoptosis por PKR a través de la ruta FADD/caspasa 8 y Apaf1/caspasas 9 (96, 97).

b) NF- κ B es un factor transcripcional formado por homo- o heterodímeros entre 5 miembros de la familia Rel. Estos incluyen a RelA o p65, RelB, c-Rel, NF- κ B1 o p50/105 y NF- κ B2 o p52/p100. p105 y p100 son precursores y necesitan ser procesados post-traduccionalmente a p50 y p52, respectivamente. Presentan un dominio RHD (*Rel homology domain*) de unión a DNA, responsable de la homo- o heterodimerización y de la interacción con el inhibidor I κ B, el cual es responsable de mantener la forma

citoplasmática inactiva de NF- κ B. La ruta canónica de la activación de este factor transcripcional (formado principalmente por los heterodímeros p50/p65 y p50/cRel) consiste en la fosforilación de I κ B por la quinasa IKK (*I κ B kinase*) y la ubiquitinización del inhibidor por el proteosoma. Esto lleva a su degradación y a la liberación de NF- κ B, el cual se transloca al núcleo, y se une a secuencias reguladoras de DNA denominadas como sitios κ B (98, 99) induciendo la expresión de genes de IFN. También se ha visto que la interacción entre FADD y el extremo C-terminal de MAVS provoca la activación de NF- κ B (100), lo que conduce nuevamente a la activación de genes de IFN.

NF- κ B es un mediador central en la expresión de genes inducidos por patógenos o citoquinas inflamatorias, y puede presentar un papel dual. Por ejemplo, la unión de TNF- α a su receptor puede promover la activación de NF- κ B, y éste inducir la muerte celular por apoptosis (101). Sin embargo, también promueve la inducción de genes anti-apoptóticos, como IAPs, aunque el resultado final viene muchas veces determinado por el tipo de estímulo. El sistema de retroalimentación entre TNF- α y NF- κ B ha sido previamente descrito. Por un lado, el promotor de TNF- α contiene sitios de unión para NF- κ B, y por otro lado, NF- κ B es activado por TNF- α a través de la activación del complejo IKK, lo que resulta en la translocación nuclear de NF- κ B (102).

c) Otra ISG que participa en la inducción de apoptosis es OAS. Esta enzima cataliza la síntesis de 2'-5' oligoadenilato dependiente de

ATP. Este compuesto induce la dimerización y activación de la ribonucleasa L (RNasaL) (97). Esta nucleasa es responsable de la degradación de ssRNA tanto viral como celular, provocando la degradación de las subunidades ribosomales 18 y 28S. Se ha señalado su papel antiviral y antiproliferativo induciendo la activación de apoptosis mediante la degradación de mRNA de proteínas anti-apoptóticas o de factores de supervivencia (56)

pro-apoptótico, facilitando la diseminación del virus (108). Por su lado, la expresión de VP2 activa la quinasa PKR, resultando en un bloqueo de la síntesis proteica y la muerte celular por apoptosis (109). Sin embargo, este efecto es eficientemente bloqueado por VP3, cuyo dominio de unión a dsRNA viral evita la activación de PKR y la apoptosis (93).

Sin embargo, muchos virus han desarrollado estrategias para antagonizar la respuesta apoptótica y poder producir su progenie viral. Tal es el caso de la proteína BHRF1 del virus EBV (*Epstein Barr virus*) (103) o la proteína CrmA del virus de la viruela bovina (CPXV)(104), las cuales participan en la inhibición de la ruta apoptótica durante la infección por estos patógenos. Por otro lado, algunos virus inducen la activación de la apoptosis, posiblemente para facilitar la liberación y la diseminación del virus. Tal es el caso del virus de la gripe, que activa la ruta mitocondrial a través de la fosforilación del factor pro-apoptótico BAD (105); o el virus de inmunodeficiencia en humanos (HIV-1) (106), que a través de la glicoproteína gp120 también promueve la apoptosis.

Tres polipéptidos de IBDV, VP5, VP3 y VP2 han sido relacionados con la inducción y el control de la respuesta apoptótica inducida por IBDV. Según la bibliografía, VP5 podría tener un papel dual, por un lado previniendo la apoptosis durante estadios tempranos de la infección viral (107), y por otro actuando como mediador

OBJETIVOS

La inducción de apoptosis y la producción de citoquinas proinflamatorias en la bolsa de Fabricio han sido señaladas como los principales procesos a nivel molecular implicados en la inmunosupresión causada en pollos tras infección con IBDV. Sin embargo, hasta el momento no se ha abordado el estudio de los mecanismos que podrían relacionar estos eventos durante la infección por este virus.

Por ello, durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral se pretende entender la contribución de la producción de IFN a la patogenia. Como se ha descrito previamente, los diferentes IFNs intervienen en procesos celulares como la apoptosis, ya sea a través de la inducción de algunas ISGs o de la activación de factores transcripcionales. Para ello, nos proponemos estudiar si la secreción exacerbada de IFN durante la infección por IBDV, por parte de células del sistema inmune, como macrófagos y linfocitos T, en la bolsa de Fabricio, podría ser responsable de la activación de apoptosis a la que son sometidos los linfocitos B previamente infectados por IBDV.

En este sentido, nuestros primeros resultados pusieron de manifiesto que el tratamiento con IFN en células previamente infectadas con IBDV causaba una apoptosis masiva. Por ello, **nos propusimos caracterizar las rutas implicadas y determinar los factores celulares y virales participantes en este proceso.** Con esta finalidad, se persiguen los siguientes objetivos:

1. **Determinar el papel de PKR en la apoptosis inducida por IBDV.**
2. **Estudiar el patrón de expresión de diferentes ISGs, factores pro- y anti-apoptóticos, tanto a nivel de transcripción como de expresión de proteínas.**
3. **Determinar la implicación de TNF- α y NF- κ B en la apoptosis producida por IBDV.**
4. **Determinar los factores virales responsables de la inducción de apoptosis.**
5. **Determinar la implicación de las rutas extrínseca e intrínseca en la apoptosis desencadenada por IBDV.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. CÉLULAS EUCARIOTAS

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron 5 líneas celulares para diferentes fines:

- HeLa (ATCC CCL-2TM): Células epiteliales humanas derivadas de un carcinoma cérvico-uterino.
- HeLa-PKR y HeLa-Control: Células generadas mediante una estrategia de silenciamiento, utilizando lentivirus que expresan un shRNA para silenciar la proteína PKR o un shRNA control, respectivamente. La obtención de estas células ha sido previamente descrita (110).
- BSC40 (ATCC CRL-2761TM): Células epiteliales de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estas células derivan de la línea celular BS-C-1 (ATCC CCL-26TM).
- DF-1 (ATCC CRL-12203TM): Células provenientes de fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*).
- QM7 (ATCC CRL-1962TM): Células provenientes del tejido muscular de codorniz (*Coturnix japonica*).
- CEC 32-511: Células embrionarias de pollo transfectadas establemente con un plásmido que expresa el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor de Mx de pollo. Cedidas por el Dr. Bernd Kasper (Instituto de Fisiología Animal, Universidad de Munich, Alemania)
- DT40 (ATCC CRL-2111TM): Linfocitos B de pollo provenientes de un linfoma inducido en la bolsa de Fabricio mediante la infección

con el virus de la leucosis aviar (ALV). Estas células se encuentran infectadas persistentemente y llevan integrado en su genoma la secuencia del DNA proviral de ALV.

- 293T/17 [HEK-293T/17] (ATCC CRL-11268TM). Células epiteliales humanas provenientes de riñón. Expresan constitutivamente el antígeno T del virus del simio 40 (SV40).

Las diferentes líneas celulares fueron cultivadas a 37°C, con una atmósfera de CO₂ al 5% y con una humedad relativa del 98%, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, (111)) (Gibco) suplementado con 100 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich), 100 U/ml estreptomicina (Sigma-Aldrich), 12 µg/ml fungizona (Gibco), 50 µg/ml gentamicina y aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma-Aldrich). Además, el medio fue suplementado con un determinado porcentaje de suero fetal bovino (FCS) (Sigma-Aldrich) dependiendo de la línea celular, 10% para HeLa, 293T y DT40, y 5% para DF-1 y QM7. Para el correcto crecimiento de las células CEC 32-511 se empleó suero fetal de pollo (chS) al 10%. Para las células BSC40 se empleó un 5% de suero de ternera recién nacida (NCS) (Sigma-Aldrich).

Las distintas líneas celulares se conservaron en nitrógeno líquido, en medio de congelación compuesto por FCS al 90% y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al 10% como agente crioprotector.

1.2. CÉLULAS PROCARIOTAS

1.2.1. Condiciones de crecimiento y mantenimiento

Para el crecimiento y purificación de los distintos plásmidos empleados se utilizaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa DH5 α . Estas células fueron crecidas en agitación a 37°C en medio de cultivo Luria Broth (LB) suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) o kanamicina (Sigma-Aldrich), dependiendo del gen de resistencia que porte cada plásmido. Para los cultivos en placa, se añadió Bacto-Agar al 1,5% al medio LB y se suplementó con uno u otro de los antibióticos mencionados anteriormente.

Las células bacterianas fueron conservadas en glicerol al 15% en medio LB y mantenidas a -80°C.

1.2.2. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias competentes (cepa DH5 α) fueron preparadas según indican Inoue y colaboradores (112). Para ello, se partió de una única colonia que fue crecida en medio LB líquido a 18°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.₆₀₀) entre 0,6 y 0,7. A continuación, el cultivo se mantuvo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en tampón de transformación TB (10 mM PIPES pH 6,7, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂ y 250 mM KCl₂) y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Después de un segundo paso de centrifugación en las mismas condiciones, el pellet resultante se resuspendió en tampón TB con DMSO al 7%.

Se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

1.2.3. Transformación bacteriana

Sobre una alícuota de 50 μ l de bacterias competentes se añadió DNA plasmídico y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. A continuación, las bacterias fueron sometidas a un choque térmico (1 minuto y medio a 42°C y 10 minutos en hielo). Se añadió medio LB y se incubó durante 1 hora en agitación (300 rpm) a 37°C. Las bacterias transformantes se sembraron en placas de LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

1.3. VIRUS

- Virus vaccinia VT7LacOI-poly: Expresa de forma inducible la poliproteína de IBDV que da lugar a partículas subvirales de IBDV carentes de material genético o VLPs (*virus like particles*).
- IBDV: Este virus, adaptado a crecer en cultivos celulares, deriva de la cepa Soroa. Pertenece al serotipo I y fue aislado de un pollo en la región de Soroa (Cuba).
- NDV-GFP: Virus recombinante de la enfermedad de Newcastle (NDV), obtenido a partir de la cepa Hitchner B1 (113), que porta la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) entre los genes P y M. Cedido por el Dr. Adolfo García-Sastre (Escuela de Medicina Mount Sinai, Nueva York, EUA).
- rVV-chIFN- α : Virus VV recombinante que expresa la proteína IFN- α de pollo (chIFN- α)

de forma inducible con IPTG. La secuencia que codifica la proteína está clonada junto con una secuencia que codifica una cola de histidinas, de este modo se facilita su posterior reconocimiento y purificación. Para la generación de este virus se utilizó como cepa parental el virus recombinante VT7LacOI (114).

2. REACTIVOS

2.1. PLÁSMIDOS

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon los siguientes plásmidos para distintos fines:

- pGEM-T *easy vector* (Promega): Vector linealizado que contiene una única timidina en ambos extremos 3', mejorando la eficiencia de clonación de aquellos productos generados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por polimerasas que añaden adeninas en ambos extremos 3'. Contiene un gen de resistencia a ampicilina (Amp^R). Este plásmido fue empleado para clonar amplicones correspondientes a los genes analizados por qRT-PCR.
- pMLM3636 (Addgene #43860): Vector de expresión en el que el gen de interés queda bajo el control del promotor humano U6 (hU6). Se ha utilizado para clonar las guías de DNA gracias a los dos sitios de restricción de la enzima *Esp3I*. Presenta un gen de resistencia a ampicilina. Plásmido cedido por el Dr. Keith Joung.
- pCas9 (Addgene #41815): Este plásmido contiene la secuencia del gen que codifica la proteína Cas9 procedente de *Streptococcus pyogenes* optimizada para su expresión en células humanas. La expresión de este gen está regulada por el promotor-amplificador CMV. El extremo C-terminal de Cas9 lleva fusionada una secuencia de localización nuclear (NLS) del virus SV40. Este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina. Plásmido cedido por el Dr. George Church (115).
- pEGFP-C1 (Clontech): Plásmido que expresa la proteína GFP, utilizado en este trabajo como control de transfección.
- pMDLg/pRRE (Addgene #12251): Codifica las proteínas Gag y Pol del virus HIV-1. Este plásmido junto con los plásmidos pRSV-Rev y pM2.G se utilizan para la obtención de pseudopartículas lentivirales. Plásmido cedido por el Dr. Didier Trono (116).
- pRSV-Rev (Addgene #12253): Codifica la proteína Rev de HIV-1. Plásmido cedido por el Dr. Didier Trono (116).
- pM2.G (Addgene #12259): Codifica la glicoproteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Plásmido cedido por el Dr. Didier Trono (116).
- pLKO.1-shRNA (Sigma-Aldrich). Plásmidos diseñados para la producción de partículas lentivirales con la finalidad de silenciar la proteína humana TNF- α (MISSION[®] shRNA Plasmid DNA, Sigma).
- pLKO.1-shRNA Control: Codifica un shRNA que no presenta homología con ninguna secuencia de mamíferos. Cedido por el Dr. Pablo Gastaminza (117).
- pVOTE.2: Vector de expresión inducible para generar recombinantes del virus VV

que contiene: la secuencia que codifica la RNA polimerasa del bacteriófago T7, el represor del operón lactosa (*lacI*) de *E. coli*, el gen GPT de *E. coli* bajo el promotor de VV P7.5 para la selección de virus recombinantes con ácido micofenólico (MPA), el promotor del bacteriófago T7, la secuencia reguladora SLO (*stem-loop/lacO*) correspondiente al operador *lac* modificado, la secuencia leader del virus de la encéfalomiocarditis (EMCV), una región con secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción para facilitar el clonaje, sitios de terminación de la transcripción en las tres ORF posibles (114). Cedido por el Dr. Bernard Moss (Instituto Nacional de la Salud, Maryland, EUA). Utilizado para generar el recombinante rVV-chIFN- α .

2.2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos empleados en los análisis por *Western Blot* en esta tesis se describen en la Tabla I.

3. METODOLOGÍA

3.1. INFECCIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

3.1.1. Infecciones con el virus IBDV

Las infecciones con IBDV se realizaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 o 0,05 UFP/célula, según sea el caso. Para células adherentes las infecciones se realizaron sobre monocapas celulares preconfluentes (<75%), en un volumen mínimo de DMEM durante 1 h, agitándolas cada 15 minutos a 37°C. Para el caso de células que crecen en suspensión,

como las células DT40, se sembraron 120.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. El volumen de infección también fue mínimo, y permanecieron en constante agitación a 37°C. Tras la hora de adsorción, se retiró el volumen de infección y se mantuvieron las células en medio DMEM con 2% de FCS durante el tiempo estimado para cada ensayo.

3.1.2. Infecciones con el virus NDV-GDP

Las infecciones con el virus recombinante NDV-GFP se realizaron en placas de 24 pocillos a 1 UFP/célula sobre monocapas celulares preconfluentes (<90%). Tras la hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM con 2% FCS. En función de cada experimento, se tomaron imágenes después del tiempo determinado con un microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000B epifluorescence microscope (*Leica Microsystems*), o se determinó la señal de la fluorescencia de la proteína GFP usando para ello un fluorímetro SpectraMax M2 (BioNova). Para este último ensayo se rasparon las células, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS. Se trasladaron las muestras a una placa negra de fondo transparente de 96 pocillos (CoStar) y se procedió a su lectura a una longitud de onda de excitación y emisión de 395 nm y 509nm, respectivamente.

3.1.3. Infecciones con el virus rVV-chIFN- α

Cultivos de células HeLa confluentes sembradas en placas de 150 mm o en placas de 6 pocillos fueron infectados con rVV-chIFN- α a una MOI

Tabla I. Relación de anticuerpos empleados

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Procedencia
anti-ISG-56	Extremo N-terminal de la proteína ISG-56 humana	Cabra	Policlonal	1:500	sc-82946 Santa Cruz Biotechnology
anti-Mx1/2/3	Región interna de la proteína humana Mx1 (aminoácidos 171-455)	Conejo	Policlonal	1:250	sc-50509 Santa Cruz Biotechnology
anti-PKR (B10)	Región que comprende los aminoácidos 1-515 de la proteína de ratón PKR	Ratón	Monoclonal	1:250	sc-6282 Santa Cruz Biotechnology
anti-PKR-P (Thr446)	Péptido sintético	Conejo	Monoclonal	1:1000	T446 Abcam
anti-eIF2α (FL-315)	Región que comprende los aminoácidos 1-315 de la proteína humana eIF2 α	Conejo	Policlonal	1:100	sc-11386 Santa Cruz Biotechnology
anti-eIF2α-P (Ser52)	Fosfopéptido de la región que contiene la Ser52 de eIF2 α humano	Conejo	Policlonal	1:1.000	44728G Invitrogen
anti-PARP	Péptido sintético que contiene el sitio de corte por caspasas	Conejo	Policlonal	1:500	#9542 Cell Signalling
anti-NF-κB-p65	Péptido sintético. Corresponde al extremo C-terminal de la proteína humana	Conejo	Policlonal	1:1.000	ab16502 Abcam
anti-eIF4GI-Nt anti-eIF4GI-Ct	Extremos amino y carboxilo terminal de la proteína eIF4GI	Conejo	Policlonal	1:5.000	Dr. Luis Carrasco ^a
anti-histona H2B	Péptido sintético correspondiente al extremo C-terminal de la proteína humana	Ratón	Monoclonal	1:5.000	ab52484 Abcam

anti-α-tubulina	Péptido sintético del extremo N-terminal de la proteína α -tubulina	Conejo	Monoclonal	1:1.000	#2125 Cell Signaling
anti-Ub (P4D1)	Proteína ubiquitina bovina	Ratón	Monoclonal	1:400	sc-8017 Santa Cruz Biotechnology
anti-β-actin (C4)	Proteína β -actina aviar	Ratón	Monoclonal	1:1.000	sc-47778 Santa Cruz Biotechnology
anti-GAPDH	Proteína GAPDH humana	Conejo	Policlonal	1:5.000	TA-308884 Origene
anti-chPKR 4849 anti-chPKR 4850	Región que comprende los aminoácidos 527-550 de la proteína PKR de pollo	Conejo	Policlonal	1:2.500	Dr. Javier Benavente ^b
anti-6x Histidinas	6x Histidinas	Ratón	Monoclonal	1:5.000	Clontech
VP2 (808)	Proteína de la cápsida de IBDV	Conejo	Policlonal	1:1.000	Dr. José F. Rodríguez ^c
VP3 (918)	Proteína VP3 de IBDV	Conejo	Policlonal	1:1.000 1:500 ^d	Dr. José F. Rodríguez ^c
anti-conejo-IgG- peroxidasa	Anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano	Cabra	Policlonal	1:5.000	Sigma-Aldrich
anti-ratón-IgG- peroxidasa	Anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano	Cabra	Policlonal	1:5.000	Sigma-Aldrich

^aDr. Luis Carrasco, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España.

^bDr. Javier Benavente, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

^cDr. José F. Rodríguez, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España.

^dDilución empleada en titulación por inmunotinción.

de 5 UFP/célula. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM con 2% de FCS y 1 mM de IPTG.

3.2. TITULACIÓN DE VIRUS

3.2.1. Titulación por ensayo de formación de placa de lisis en medio líquido

La titulación del virus rVV-chIFN- α se llevó a cabo en medio líquido, para ello se emplearon cultivos de células BSC40 sembradas en placas de 6 pocillos al 80% de confluencia. Estas células fueron infectadas con diluciones seriadas (1/10) del stock del virus rVV-chIFN- α en medio DMEM. Tras una hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM con 2% NCS. A las 48 h p.i. se observaron las placas de lisis al microscopio óptico, se retiraron los sobrenadantes y se realizó una tinción con una solución de cristal violeta al 1% preparado en 20% de metanol. Una vez aclaradas y secas las placas multipocillos, se procedió al recuento de placas de lisis y el título viral se expresó en UFP/ml.

3.2.2. Titulación por ensayo de formación de placa de lisis en medio sólido

Las muestras de IBDV se titularon por duplicado en células QM7 a una confluencia del 50%. Para ello las monocapas celulares fueron infectadas con diluciones seriadas 1/10 preparadas en medio DMEM. Tras la hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió sobre las células una mezcla de medio de cultivo (DMEM 2X con 2% de FCS y 160 μ g/ml de DEAE-dextrano) y agar al 1,4% en una relación 1:1. A las 72 h p.i., se procedió de dos formas diferentes, como se

indica en los apartados 3.2.2.1. y 3.2.2.2.

3.2.2.1. Titulación por inmunotinción

Se retiró el medio con agar y se fijaron las células con una mezcla de metanol:acetona (1:1) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS, se bloqueó la monocapa con una mezcla de PBS suplementado con FCS al 3% durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió el anticuerpo primario contra la proteína viral VP3, diluido 1:500 en la misma mezcla anterior, y se incubaron las células durante 1 h. Tras 3 lavados con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante otra hora. Para el revelado de las placas de lisis se añadió sobre la monocapa una solución de H_2O_2 /3, 3'-diaminobencidina (Sigma), en presencia de $NiSO_4$ al 3%, y tras 1 minuto de incubación se retiró el medio de revelado, se lavaron los pocillos con PBS y se procedió al recuento de placas de lisis. El título viral se expresó en UFP/ml.

3.2.2.2. Titulación por tinción con cristal violeta

La titulación de sobrenadantes provenientes de células HeLa, DF-1 o DT40 infectadas con IBDV se realizó por tinción con cristal violeta. Para ello, antes de retirar el agar, las células se fijaron con formaldehído al 10% durante 30 minutos, y a continuación se retiró el medio con agar y se tiñeron las células con una solución de cristal violeta al 1% preparado en 20% de metanol. Una vez aclaradas y secas las placas multipocillos, se procedió al recuento de placas

de lisis y el título viral se expresó en UFP/ml. Ambas metodologías son de igual precisión, por lo que se eligió titular los sobrenadantes por tinción con cristal violeta por su mayor simplicidad y conveniencia para la titulación de un elevado número de muestras.

3.3. PURIFICACIÓN DE VIRIONES DE IBDV

Los viriones presentes en sobrenadantes de células QM7 infectadas con IBDV se concentraron mediante la adición de 20% PEG (polietilenglicol) diluido en una solución 3M de NaCl, en una proporción de 1:5 (v:v). Esta mezcla se mantuvo durante 72 h en agitación suave a 4°C, a continuación, se centrifugó a 3.500 rpm durante 30 minutos, consiguiendo precipitar el virus. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 10 ml de tampón PES (25 mM PIPES pH 6,2, 5M NaCl y 20 mM CaCl₂) suplementado con inhibidores de proteasas (*cOmplete protease inhibitor cocktail EDTA-free*, Roche). Por último, para una mejor conservación del virus, se añadió glicerol al 10%, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C. La titulación del virus se realizó por ensayo de formación de placas de lisis en medio sólido, y posterior inmunotinción con anticuerpos frente a la proteína VP3 de IBDV para facilitar la visualización de las mismas (ver sección 3.2.2.1.).

3.4. PURIFICACIÓN DE VIRIONES DE IBDV POR COLCHÓN DE SACAROSA

Para experimentos que requerían una mayor purificación del virus, los viriones concentrados con PEG se sometieron a ultracentrifugación

a 37.000 rpm durante 2 h y 30 minutos en un colchón de sacarosa al 25% en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc*). El *pellet* fue resuspendido en tampón PES y se centrifugó a 1.500 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se añadió sobre un gradiente lineal de sacarosa de 20-50% y se sometió nuevamente a ultracentrifugación en un rotor SW41 a 40.000 rpm durante 45 minutos. A continuación, los gradientes se repartieron en 12 fracciones, y estas se sometieron a ultracentrifugación a 50.000 rpm durante 2 h en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc*). Por último, se descartaron los sobrenadantes y los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 100 µl de tampón PES. Las fracciones fueron analizadas por *Western Blot* y microscopía electrónica de transmisión.

3.5. PURIFICACIÓN DE PSEUDOPARTÍCULAS VIRALES (VLPs)

Para la purificación de VLPs, se sembraron células BSC40 en 10 placas de 150 mm a una confluencia del 70% y se infectaron a una MOI de 5 UFP/célula con el virus VT7LacOI-poly. Tras la hora de adsorción se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM suplementado con 2% NCS y 1 mM IPTG. A las 72 h p.i. se recogieron las células y las VLPs presentes en los sobrenadantes fueron sometidos a purificación por colchón de sacarosa tal y como indica en el apartado 3.2.

El análisis de las distintas fracciones se realizó mediante *Western Blot* y microscopía electrónica de transmisión.

3.6. TRANSFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES

A no ser que se diga lo contrario, que en su caso vendrá indicado en cada apartado, las transfecciones se realizaron en placas de 24 pocillos, utilizando el agente de transfección Lipofectamina 2000 (Life Technologies) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó un ratio 1:1 de RNA:lipofectamina o 1:2 de DNA:lipofectamina. Las cantidades de RNA y DNA empleadas se indican en cada caso en el apartado correspondiente de resultados. Estas mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron sobre las células cultivadas en medio DMEM, en ausencia de antibióticos, y con el porcentaje de suero correspondiente. A las 4-5 h post transfección (h p.t.) el medio se cambió por medio completo.

Las transfecciones llevadas a cabo con RNA de doble cadena (dsRNA) de origen sintético poly (I:C) (ácido poliinosínico: policitidílico, Sigma-Aldrich) fueron realizadas durante 16 h.

3.7. OBTENCIÓN DEL VIRUS rVV-chIFN- α

Para este trabajo se generó un recombinante del virus VV (rVV) que expresa de forma inducible el IFN- α de pollo (chIFN- α), unido en su extremo N-terminal a una cola de histidinas para facilitar su identificación y purificación. Para ello, se infectaron monocapas subconfluentes de células BSC40, crecidas en placas de 60 mm, con el virus VVLacOI, en medio DMEM sin suero, a una MOI de 0,05 UFP/célula. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo, se lavaron las células dos veces con DMEM suplementado

sólo con aminoácidos no esenciales y se dejó un volumen de 2 ml de dicho medio. Se añadió la mezcla de transfección correspondiente a 5 μ g del plásmido recombinante (pVOTE-chIFN- α , ver sección 3.8.4) y 10 μ l de lipofectamina 2000 en 400 μ l de medio Opti-MEM, preincubada 20 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron las células de 4-5 horas a 37°C, se retiró el medio de transfección y se añadieron 4 ml de DMEM completo suplementado con NCS al 2%. A las 48-72 horas postinfección (h p.i.), tras observar un efecto citopático completo, se recogieron las células en el mismo medio mediante raspado, se lisaron congelando y descongelando tres veces y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} del sobrenadante y se infectaron nuevas células BSC40 sembradas en una placa de 6 pocillos. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadieron 3 ml por pocillo de una mezcla 1:1 de medio DMEM 2X y agar al 1,9% suplementada con NCS al 2%, ácido micofenólico (25 μ g/ml), xantina (250 μ g/ml) e hipoxantina (15 μ g/ml). Se incubaron las células a 37°C hasta la aparición de placas de lisis (48-72 h p.i.), se tiñeron las células con rojo neutro (Sigma-Aldrich) y se picaron varias placas que se utilizaron para infectar nuevos cultivos celulares. El proceso de selección se repitió al menos tres veces para asegurar que las placas picadas correspondían exclusivamente a virus recombinantes.

3.7.1. Preparación del stock del virus rVV-chIFN- α

Para la producción de un stock del virus

rVV-chIFN- α , se infectaron 5 placas de 150 mm de células BSC40 a un 80% de confluencia a una MOI de 0,01 UFP/célula. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con NCS al 2%. A las 48-72 h p.i., tras observar un efecto citopático completo, se procedió a recoger las células en el mismo medio de crecimiento, y se sometieron a centrifugación (1.500 rpm durante 5 minutos). Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en DMEM. Se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación y a 3 pulsos de sonicación de 10 segundos a 80 V cada uno. El lisado obtenido se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos, se recogió el sobrenadante, se hicieron alícuotas y se congelaron a -80°C hasta su titulación.

3.8. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.8.1. PCR

Las reacciones de PCR fueron realizadas empleando la enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) en un volumen final de 25 μ l con 1 U de la polimerasa, el tampón 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,2 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Invitrogen), 0,2 μ M de cada cebador y 1,5 mM de $MgCl_2$. La reacción se incubó durante 2 minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la T_m (temperatura de fusión de los cebadores) y 1 minuto por kilobase (kb) a 72°C; y finalmente, 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Los productos de PCR fueron analizados en

geles de agarosa del 1% al 1,5% en presencia de *SYBR Safe* (Invitrogen) para su visualización.

3.8.2. Purificación de DNA

Para la purificación de DNA plasmídico a menor o a media escala a partir de cultivos bacterianos se empleó el kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) o *DNA, RNA and protein purification* (Macherey-Nagel), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la purificación de fragmentos de PCR se empleó el kit *High Pure PCR Product Purification kit* (Roche).

La cantidad del DNA fue cuantificada con el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (*NanoDrop Technologies*, EUA).

3.8.3. Clonaje en el plásmido pGEM-T easy vector

Los fragmentos correspondientes a los genes a estudiar por qRT-PCR se obtuvieron por PCR, y fueron clonados en el plásmido pGEM-T *easy vector* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se mezcló el plásmido junto con el fragmento a clonar en una relación 1:3 o 1:6. La reacción de ligación se incubó durante toda la noche a 16°C.

3.8.4. Clonaje del gen de chIFN- α en el plásmido pVOTE.2

El fragmento correspondiente al gen de chIFN- α fue obtenido por síntesis química a partir de la secuencia depositada en el NCBI, a la que se añadieron las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* para facilitar su clonaje en el vector pVOTE.2, y

que nos fue proporcionado en el vector pUC57 (pUC57-chIFN- α). El plásmido pUC57-chIFN- α fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y el fragmento obtenido fue clonado en el vector pVOTE.2, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción mediante ligación de extremos compatibles.

3.8.5. Extracción de RNA

El RNA total fue purificado a partir de las diferentes líneas celulares usando el kit de aislamiento *High pure RNA isolation kit* (Roche), siguiendo para ello las instrucciones del fabricante.

Para la purificación del RNA de doble cadena (dsRNA) de IBDV se partió de viriones de IBDV obtenidos según indica el apartado 3.3. De esta forma, el *pellet* de virus obtenido se resuspendió en 150 μ l de tampón PES y se incubó durante 24 h a 4°C. Al día siguiente se añadió 15 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y se calentó la mezcla a 100°C durante 3 minutos. A continuación, la muestra se trató con 2 mg/ml de proteinasa K durante 1 h a 37°C, y se procedió al aislamiento de RNA empleando el agente comercial TRIzol (*Life Technologies*), siguiendo las instrucciones de fabricante. Las muestras de RNA fueron tratadas a 37°C durante 30 minutos con 50 U/mg de RNasa T1 (Roche), que digiere específicamente RNA de cadena simple, y a continuación se purificó el dsRNA de IBDV mediante adsorción a columnas de gel de sílice (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad del RNA fue cuantificada con el espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (*NanoDrop Technologies*, EUA).

Para determinar la integridad de los RNA extraídos, estos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TBE (90 mM TrisHCl pH 8, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA) en presencia de bromuro de etidio (BrEt). Para la preparación de las muestras y el tampón se empleó el reactivo dietil pirocarbonato (DEPC), para asegurar unas condiciones libres de RNasas.

3.8.6. Retrotranscripción del RNA

Para obtener las muestras de DNA complementario (cDNA) correspondientes a los mRNAs de los genes cuya expresión queremos estudiar, utilizamos en todos los casos 500 ng de RNA, que fueron sometidos a transcripción inversa por la *Super Script® III* (Invitrogen). Para ello, el RNA fue añadido a una mezcla de 10 mM de dNTPs y 200 ng de hexámeros aleatorios (Roche), y se incubó durante 5 minutos a 65°C, seguido de 1 minuto en hielo. A continuación, se añadió una mezcla que contenía el tampón de la enzima 5X (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 275 mM KCl y 15 mM MgCl₂), 5 mM de ditioneitol (DTT), 200 U de transcriptasa inversa y 40 U del inhibidor de ribonucleasas rRNasin® (Promega). La reacción se incubó durante 5 minutos a 25°C, 50 minutos a 50°C y 15 minutos a 70°C. Las muestras de cDNA fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

3.8.7. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

El cDNA fue amplificado y cuantificado por PCR cuantitativa usando el reactivo comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*) en un termociclador 7500

Real Time PCR System (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación y normalización de los mRNAs humanos y de pollo se utilizó la cuantificación de los mRNAs de las enzimas hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), respectivamente. Los datos obtenidos se representan en unidades relativas. Inicialmente, se determinó la concentración óptima de cada par de cebadores para evitar la formación de dímeros de cebadores. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 2. La optimización se realizó a partir de los plásmidos pGEM-T *Easy Vector* que contenían las secuencias a amplificar por cada pareja de cebadores. Se hicieron diluciones seriadas de los mismos 1/10 para obtener las curvas patrón. Estas curvas cumplían con los parámetros de regresión lineal (0,99-1) y los valores de pendiente (cercasas a -3,2) que medían la eficiencia de la reacción. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos, en las que se incluían las muestras correspondientes a las curvas patrón, una dilución 1/10 de las muestras de cDNA, y los controles negativos respectivos.

3.9. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.9.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y análisis por *Western Blot*

Las monocapas celulares fueron lavadas con PBS y recogidas en tampón Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,01%

de azul de bromofenol, 10% glicerol y 5% β -mercaptoetanol), calentadas a 100°C durante 3 minutos, y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (acrilamida:bisacrilamida [29:1]) (Bio-Rad) en condiciones desnaturizantes con SDS (SDS-PAGE). Para la detección de proteínas fosforiladas se añadió al tampón Laemmli el reactivo comercial PhosStop (Roche). A continuación, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro (Bio-Rad), utilizando tampón de transferencia (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0,1% SDS y 20% metanol) y el sistema Transblot SD Semidrycell (Bio-Rad). Para comprobar la correcta transferencia de las proteínas, se realizó una tinción reversible de las membranas con rojo Ponceau-S (Sigma-Aldrich) al 0,2% en una solución de ácido acético al 3%. Luego, se lavaron con TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) conteniendo Tween-20 al 0,05% o al 0,25% (TBS-T), se bloquearon las membranas con leche desnatada al 5% preparada en TBS-T, y se mantuvieron durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Luego, se incubaron a 4°C durante toda la noche en agitación con la adecuada dilución del anticuerpo primario (Tabla 1) específico contra la proteína a detectar, preparado en la misma solución de bloqueo. Tras 3 lavados con TBS-T, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario, preparado en la misma solución de bloqueo, durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Nuevamente, se procedió a dar 3 lavados con TBS-T. Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia,

Tabla 2. Cebadores empleados para el estudio por qRT-PCR

Gen	Cebador <i>Forward</i> (5' a 3')	Cebador <i>Reverse</i> (5' a 3')
<i>IFNB</i>	GTCAGAGTGGAATCCTAAG	ACAGCATCTGCTGGTTGAAG
<i>ISG-56</i>	GGGCAGACTGGCAGAAG	CTATAGCGGAAGGGATTGTA
<i>ISG-15</i>	CAGCGAACTCATCTTTGCCAGTA	CCAGCATCTTCACCGTCAGG
<i>Mx1</i>	ACAGGACCATCGGAATCTTG	CCCTTCTTCAGGTGGAACAC
<i>EIF2AK2 (PKR)</i>	GCGATACATGAGCCCAGAACAGA	CAAGAATTAGCCCCAAGCGTAGA
<i>BAK</i>	TTGCCACCAGCCTGTTTGAGA	GAAGCCCAGAAGAGCCACCAC
<i>TRAIL</i>	TGGGACCAGAGGAAGAAGC	CAGGAATGAATGCCCACTC
<i>FAS</i>	TTGTGTGATGAAGGACATGGC	GGTCCGGGTGCAGTTTATTTTC
<i>TNFA</i>	AGTGAAGTGCTGCCAACAC	GAGGAAGGCCTAAGGTCCA
<i>BCL2</i>	GAGAGCGTCAACCGGGAGATGTCG	GGTGTGCAGGTGCCGGTTCAGGTA
<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>VP3</i>	AAGGGCAGCTACGTCGATCTAC	TGGCAACTTCGCTCTATGAAAGC
<i>chIFNB</i>	ACCAGGATGCCAACTTCTCTTGGA	ATGGCTGCTTGCTTCTGTCTTG
<i>chMDA5</i>	TGAAGGCAAAGAGAGATCAGCGTAAGA	CATATCAATTGTGGCAATTCTTGCACAGGA
<i>chTLR3</i>	GGATCCATGGTGCAGGAAGTT	TCGACTTTGCTCAATAGCTTGCT
<i>chMx</i>	TTCACGTCAATGTCCAGCTTTGC	ATTGCTCAGGCGTTTACTTGCTCC
<i>chTNFA</i>	TGTTCTATGACCGCCAGTTC	GACGTGTCACGATCATCTGGTT
<i>chTRAIL</i>	TCTGTAGAACAGGACACGAAGCA	ACAGGGAGCCTGGTTTTGC
<i>chGAPDH</i>	ATCAAGAGGGTAGTGAAGGCTGCT	TCAAAGGTGGAGGAATGGCTGTCA

ch (cebadores correspondientes a genes de pollo)

utilizando el sistema ECL (GE *Healthcare*) o el reactivo *SuperSignal®West Dura Extend Duration Substrate* (Thermo Scientific) y películas de auto-radiografía (Konika Minolta Medical & Graphic, Inc. o Kodak Biomax XAR film), o mediante el desarrollo de color, utilizando para ello una solución de 4-cloro-1-naftol (3 mg/ml en DMSO) en PBS y peróxido de

hidrógeno al 1%. Este último procedimiento se empleó cuando la señal de quimioluminiscencia era demasiado intensa.

3.9.2. Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas empleando el kit *Micro BCATM Protein Assay Kit*

(*Thermo Scientific*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia fue medida a 562 nm en un lector de microplaca (*Biochrom EZ Read 400 2.2 version*).

3.9.3. Análisis cuantitativo de proteínas

Para cuantificar la cantidad relativa de cada banda respecto al control de carga se empleó el programa de libre acceso ImageJ, utilizando el método descrito en la siguiente página web: <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>

3.10. PRODUCCIÓN Y TITULACIÓN DE IFN- α DE POLLO (chIFN- α)

3.10.1. Ensayo de expresión de chIFN- α en células infectadas con el virus rVV-chIFN- α

Células HeLa sembradas en placas de 6 pocillos fueron infectadas a una MOI de 5 UFP/célula con el virus rVV-chIFN- α . Tras la hora de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM y 1 mM de IPTG. Las infecciones fueron recogidas a 8, 16 y 24 h p.i. para determinar el momento en el que se produce una mayor expresión de la proteína chIFN- α . Como controles negativos, se recogieron a los mismos tiempos células infectadas sin tratamiento con IPTG. A los tiempos de infección elegidos, las células fueron recogidas en tampón Laemmli para ser analizadas por *Western Blot*. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 1.500 rpm durante 5 minutos para retirar los restos celulares, filtrados a través de filtros de 0,1 μ m para eliminar el virus rVV-chIFN- α y guardados a -80°C. Estos sobrenadantes fueron empleados

para realizar un estudio de funcionalidad biológica del chIFN- α producido en células DF-1 (ver sección 3.12.).

3.10.2. Purificación del chIFN- α

Para la obtención y purificación de chIFN- α sembramos células HeLa en 12 placas de 150 mm y las infectamos con el virus rVV-chIFN- α a una MOI de 5 UFP/célula, tal y como se indica en el apartado 3.1.3. Los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados a través de filtros 0,1 μ m y resuspendidos en tampón A (50 mM Tris-HCl pH 8), suplementado con inhibidores de proteasas (*cOmplete protease inhibitor cocktail EDTA-free*, Roche). Estos sobrenadantes se utilizaron para la purificación de la proteína recombinante IFN- α de pollo (chIFN- α) por cromatografía de afinidad con una resina de cobalto (*Talon Metal Affinity Resin*, Clontech). Para ello, se emplearon 2 ml de resina y tanto el equilibrado como los lavados de la resina se realizaron con el tampón A. La incubación de los sobrenadantes con la resina se hizo en agitación a 4°C durante 1 h. Para la recuperación de la máxima cantidad de chIFN- α , se llevaron a cabo dos eluciones consecutivas con 2 mL de 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl y 0,5 M de imidazol a pH 6,4, cada una de ellas. Se recogieron diferentes muestras durante la purificación que se analizaron por *Western Blot* y tinción con plata, para analizar la eficacia del proceso. Para eliminar los restos de imidazol, los eluidos fueron dializados frente a 20mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8 en *cassette* de diálisis con un límite de exclusión de 3,5 KDa (*Slide-A-Lyzer™ G2 Dialysis Cassette, 3mL; Thermo Scientific*).

3.10.3. Titulación del chIFN- α

Para la titulación del chIFN- α en los eluidos descritos en el apartado 3.10.2. se empleó un bioensayo basado en la medida de luminiscencia, propuesto por Schwarz y colaboradores (88). A partir de un conjunto de diluciones se determina aquella capaz de activar al 50% el promotor del gen Mx de pollo, utilizando las células CEC 32-511, descritas en el apartado 1.1, que tienen en su genoma el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de Mx. Para ello, se sembraron células CEC 32-511 en placas de 96 pocillos a una confluencia del 90%. Las monocapas se trataron con diluciones seriadas (1/4) de ambos eluidos durante 6 horas, y a continuación se procedió a la medida de la actividad luciferasa, utilizando el kit *Luciferase Report Assay* (Promega). Para ello, las células fueron recogidas en 20 μ l del reactivo *Passive Lysis Buffer*. Se añadieron, por duplicado, 5 μ l de cada muestra sobre pocillos de placas de fondo blanco. Para la lectura de la luminiscencia en las placas se utilizó un luminómetro *Orion II Microplate Luminometer* (Titertek Berthold). A partir de estos valores de luminiscencia, se determinó el título aplicando la fórmula establecida por Reed-Müench (118). De esta forma el título de IFN se expresó en U/ml en función de aquella dilución que consiguiese una activación máxima del 50% del promotor de Mx.

3.11. TRATAMIENTO CON IFN COMERCIAL

Las células fueron tratadas con las cantidades y condiciones indicadas en cada caso con IFN- α humano (hIFN- α) (*Merck Sharp and Dohme*),

IFN- β humano (hIFN- β) (pbl, *Assay Science*) o IFN- γ de pollo (chIFN- γ) (*Kingfisher*).

3.12. ENSAYO BIOLÓGICO

Para determinar la actividad biológica de los diferentes IFNs utilizados se sembraron células HeLa o DF-1, según el caso, en placas de 24 pocillos y fueron tratadas con diluciones seriadas del IFN en estudio durante 16 h. Al día siguiente, se retiraron los medios de tratamiento y cada pocillo fue infectado con el virus NDV-GFP durante 24 horas. A continuación se procedió a cuantificar la expresión de la proteína GFP según indica el apartado 3.1.2.

3.13. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

El kit de imagen celular *LIVE/DEAD® Cell Imaging Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) fue utilizado para discriminar entre células vivas y muertas siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron volúmenes iguales de los reactivos proporcionados en el kit sobre las monocapas celulares crecidas en placas de 24 pocillos y sometidas al correspondiente tratamiento. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos, y a continuación se procedió a su análisis. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de epifluorescencia *Leica DMI6000B epifluorescence microscope* (*Leica Microsystems*).

Según el ensayo, se utilizó el reactivo MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Bromuro de difeniltetrazolium) (*Sigma*) para medir la viabilidad celular. De esta forma, transcurrido el tiempo indicado en cada experimento, se añadió

al medio de cultivo 25 µl de 5 mg/ml de MTT durante 20 minutos a 37°C. Durante este tiempo, las células metabólicamente activas reducen el MTT, gracias a la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, a cristales de color morado (formazán). A continuación, se retiró el medio y se añadió 100 µl de DMSO para disolver los cristales formados. La absorbancia fue medida a 545 nm en un lector de microplaca (*Appliskan Thermo Scientific*).

3.14. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los viriones de IBDV, así como las VLP purificados por gradiente de sacarosa, fueron sometidos a tinción negativa durante 1 minuto sobre una gota de acetato de uranilo al 2%. Las micrografías fueron tomadas en un microscopio electrónico de transmisión 1200 EX II (Jeol) operado a 100 kV.

3.15. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

3.15.1. Activación de las caspasas 3/7, 8 y 9

La determinación de la activación de las caspasas 3/7, 8 y 9 se realizó empleando los kits *Caspase-Glo 3/7, 8 y 9 assay kits* (Promega). Estos kits se basan en la presencia de un sustrato que contiene el tetrapéptido diana de estas caspasas, que al ser cortado, libera el sustrato de la luciferasa. De esta manera, la luminiscencia emitida es proporcional a la actividad de las caspasas presentes en cada muestra. En el caso de los kits Caspase-Glo 8 y 9, la adición del inhibidor del proteosoma (MG132) reduce significativamente el fondo y mejora la confianza de los datos.

El análisis se llevó a cabo empleando 25 µl del

lisado celular, el cual fue transferido a placas de 96 pocillos de fondo blanco, al que se le añadió 25 µl del reactivo proporcionado en el kit correspondiente. Las placas fueron incubadas en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente y se midió la actividad de la luciferasa utilizando el luminómetro *Orion II Microplate Luminometer* (Titertek Berthold).

3.15.2. Tratamiento con el inhibidor de la PKR

Cultivos de células DF-1 fueron tratados de forma continua con el inhibidor de la PKR, *PKR inhibitor I C16* (Calbiochem) a 0,5 µM durante toda la infección. Como control negativo, se trataron las células con DMSO.

3.15.3. Tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132

Para determinar la concentración óptima de MG132 (Sigma) para lograr la inhibición de la activación de NF-κB-p65, y asegurar una adecuada viabilidad celular, se crecieron células HeLa en placas de 24 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de MG132 (0,5, 2, 5, 10 y 20 µM) durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se midió la viabilidad celular empleando el reactivo MTT (ver sección 3.13). Una vez determinada la concentración óptima del inhibidor, tratamos los cultivos de células HeLa infectados o no infectados con IBDV, de forma continua con MG132. Las muestras se recogieron a los tiempos especificados y se procedió a su análisis según cada experimento. Como control negativo se trataron las células con DMSO.

3.15.4. Tratamiento con inhibidores de caspasas

Se emplearon 3 inhibidores irreversibles: inhibidor de la caspasa 8 (z-IETD-fmk), de la caspasa 9 (z-LEHD-fmk) y el inhibidor general de las caspasas z-VAD-fmk (Calbiochem). Las células HeLa infectadas o no infectadas con IBDV fueron tratadas con 50 μ M de cada inhibidor durante toda la infección. Como control negativo, se trataron las células con DMSO.

3.15.5. Cuantificación de células apoptóticas a tiempo real

Células DF-1 y HeLa infectadas o no fueron tratadas con 20 μ l del reactivo fluorescente (Essen BioScience). Este reactivo contiene el tetrapéptido diana de las caspasas 3 y 7, que al ser reconocido, libera un marcador fluorescente capaz de intercalarse en el DNA, facilitando el reconocimiento de las células apoptóticas. Las células se incubaron en el aparato *IncuCyte® Zoom System* y, fueron monitorizadas, usando objetivos 10x, en 4 zonas aleatorias de la monocapa celular cada 30 minutos, hasta el tiempo estipulado para cada experimento. Además este sistema permite la cuantificación de células apoptóticas mediante el *software IncuCyte Zoom*.

3.16. FRACCIONAMIENTO CELULAR: PREPARACIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS

A partir de células HeLa crecidas en placas de 24 pocillos, se realizó un fraccionamiento celular para separar la estructura nuclear de la fracción citosólica, mediante la alteración de la

membrana celular, y la posterior centrifugación diferencial, usando para ello el kit *NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents* (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

3.17. SILENCIAMIENTO GÉNICO UTILIZANDO VECTORES LENTIVIRALES

3.17.1. Generación de partículas lentivirales

Los vectores lentivirales fueron generados en células 293-T cotransfectando los plásmidos necesarios (pMDLg/pRRE, pMD2.G y pRSV-Rev) para el empaquetamiento del shRNA (*short hairpin RNA*) correspondiente.

Para ello, se utilizó fosfato cálcico como medio de transfección. De esta forma, se añadió 5 μ g del plásmido pLKO.1 que porta la secuencia del shRNA correspondiente, 10 μ g de pMDLg/pRRE, 3,6 μ g de pRSV-Rev y 3 μ g de pM2.G sobre 500 μ l de 250 mM CaCl_2 . La mezcla resultante se añadió gota a gota sobre 500 μ l de la solución HBS (50 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_4 , 140 mM NaCl y pH 7,05) y la mezcla se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió, nuevamente, gota a gota sobre células 293-T crecidas en placas de 100 mm al 50% de confluencia en medio DMEM con 10% FCS sin antibióticos.

Al día siguiente, se reemplazó el medio de transfección con medio de cultivo completo y suplementado con FCS al 10%.

Por último, los sobrenadantes fueron recolectados a las 36 h después de la transfección, filtrados a través de filtros de 0,45 μ m y almacenados a -80°C para su uso posterior.

3.17.2. Titulación de partículas lentivirales

Estas partículas, cuya función es la de introducir DNA exógeno en la célula diana, carecen de capacidad replicativa, por lo que no puede titularse de forma tradicional. Por ello, se realizó una titulación funcional, basada en su capacidad de expresar el gen de resistencia a puromicina, con la finalidad de determinar el volumen mínimo necesario para transducir toda la monocapa celular. Se utilizaron distintos volúmenes, desde 200 a 500 µl de las preparaciones de lentivirus para transducir células HeLa sembradas en placas de 24 pocillos. Tras 24 h, se añadió como agente de selección 2 µg/ml de puromicina. Para cada tipo de lentivirus, se determinó como volumen adecuado aquél mínimo necesario para mantener la monocapa intacta al tercer día de selección con este

antibiótico. Además, como control negativo, se añadió puromicina a células sin transducir.

3.17.3. Obtención de células HeLa silenciadas de forma transitoria para TNF-α utilizando partículas lentivirales

Para el silenciamiento de la expresión de TNF-α se emplearon 5 shRNA (sh1, sh2, sh3, sh4 Y sh5; Sigma-Aldrich), cuya secuencia se encuentra clonada en el plásmido pLKO.1-Puro bajo el control del promotor U6. Se empleó un pLKO.1-shRNA Control como control del silenciamiento. Las secuencias de los shRNA se detallan en la Tabla 3. Para ello, células HeLa sembradas en placas de 12 pocillos fueron transducidas con 1 ml por pocillo del correspondiente lentivirus, y a las 24 h post transducción fueron sometidas a selección con 2 µg/ml de puromicina, tal y como

Tabla 3. Secuencia de los shRNA utilizados para el silenciamiento génico de TNF-α

Plásmido	Secuencias shRNA	Referencia Sigma-Aldrich
pLKO.1-sh1	CCGG <u>GACTCAGCGCTGAGATCAATC</u> CTCGAG <u>GATTGATCTCAGCGCTGAGTC</u> TTTTTG	TRCN0000355911
pLKO.1-sh2	CCGG <u>CTGTAGCCCATGTTGTAGCAA</u> CTCGAG <u>TTGCTACAACATGGGCTACAG</u> TTTTT	TRCN0000003757
pLKO.1-sh3	CCGG <u>CAGGTCTACTTTGGGATCATT</u> CTCGAG <u>AATGATCCCAAAGTAGACCTG</u> TTTTT	TRCN0000003759
pLKO.1-sh4	CCGG <u>GCAGGTCTACTTTGGGATCAT</u> CTCGAG <u>ATGATCCCAAAGTAGACCTGC</u> TTTTT	TRCN0000003758
pLKO.1-sh5	CCGG <u>GGAGCCAGCTCCCTCTATTTA</u> CTCGAG <u>TAAATAGAGGGAGCTGGCTCC</u> TTTTTG	TRCN0000355913
pLKO.1 shControl	CCGGTA <u>ATTCTCCGAACGTGTACAGTT</u> TCAAGAG <u>AACGTGACACGTTCCGAGAA</u> TTTTTTTTG	Secuencia de <i>Thermotoga</i> sp. Sin homología en mamíferos

Se muestra en subrayado las secuencias diana para el silenciamiento del gen en estudio

Tabla 4. Secuencias de los cebadores empleados para determinar el silenciamiento de la proteína TNF- α humana por RT-PCR cuantitativa.

Secuencia (5'-3')	
sh1, sh3 y sh4	F: CCAGCTGGAGAAGGGTGAC
	R: GAGGCGTTTGGAAGGTT
sh2	F: GGCCAGGCAGTCAGATC
	R: GCTTGAGGGTTGCTACAAC
sh5	F: CAGATGTTCCAGACTTCCTTGAG
	R: CCCCGGTCTCCCAATAAAT

F: forward; R: reverse

se indica en el apartado 3.17.2. A los 12 días post transducción, se realizaron los experimentos oportunos. Como control, se transdujeron las células con un lentivirus shRNA control. Este proceso se repitió desde su inicio para cada experimento en el que se requería el silenciamiento de TNF- α . Se realizó RT-PCR cuantitativa para confirmar el silenciamiento de TNF- α . Para ello, las células fueron transfectadas con poly (I:C) (1 μ g/ml) para inducir la expresión de TNF- α a 4 y 12 días post transducción. Los cebadores empleados se recogen en la Tabla 4.

3.18. SILENCIAMIENTO GÉNICO UTILIZANDO RNAS SILENCIADORES

Para el silenciamiento de la expresión de la proteína MAVS se utilizó un RNA interferente (siRNA) sintético específicamente diseñado contra el RNA mensajero que codifica la proteína MAVS (119). Para ello, sembramos células HeLa en placas de 60 mm a una confluencia del 60%, y se transfectaron con 50 nM del siRNA, utilizando agente de transfección DharmaFECT™ (Dharmacon™). Como control se empleó 50 nM de un siRNA control. La mezcla

de transfección se añadió sobre células en medio DMEM con aminoácidos no esenciales y 10% FCS, en ausencia de antibióticos. Al día siguiente se cambió el medio por DMEM completo suplementado con 10% FCS. A las 72 h p.t., las células se levantaron y se sembraron en placas de 24 pocillos para analizar el silenciamiento por *Western Blot* y realizar los experimentos oportunos. Las secuencias de los siRNA (Dharmacon™) se recogen en la Tabla 5.

3.19. DELECIÓN DE LA REGIÓN DE UNIÓN A dsRNA DEL GEN PKR DE POLLO (chPKR) POR LA TECNOLOGÍA CRISPR/CAS9

3.19.1. Diseño de guías

La nucleasa Cas9 emplea unas secuencias de unos 20 pares de bases (pb), denominadas guías, para llevar a cabo su función nucleasa en el gen diana. Aprovechando este sistema, se logra la pérdida funcional del gen diana o la introducción de mutaciones. En esta tesis doctoral el objetivo era conseguir una delección del gen PKR de pollo en la región de unión a dsRNA. Con este fin, se diseñaron dos guías para producir un doble corte en el gen PKR

Tabla 5. Secuencias de los RNAs de interferencia.

siRNA	Secuencia (5'-3')
-MAVS	F: UAGUUGAUCUCGCGGACGA dTdT
	R: UCGUCCGCGAGAUCAACUA dTdT
-Control	F: AUGUAUUGGCCUGUAUUAG
	R: CUAUACAGGCCAAUACAU

Descritos por Mc Allister y Samuel (119). F: *forward*; R: *reverse*

(Fig 5), y conseguir la pérdida de la región de PKR que codifica el dominio de unión a dsRNA y parte de la región que codifica el dominio de unión a ATP, y su centro activo.

Para el diseño de estas secuencias guías, se utilizó la herramienta informática CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>). El programa encuentra estas secuencias únicas en el genoma del pollo, y determina el porcentaje de fidelidad para la actividad de la enzima Cas9 (*efecto on-target*)

Se seleccionaron aquellas secuencias cuyo porcentaje fuese el más alto, para garantizar el

mínimo efecto *off-target*. Se añadió a cada guía extremos compatibles para que puedan ser clonados en el plásmido pMLM3636 gracias al programa ZiFit (<http://zifit.partners.org/ZiFit/>). Las secuencias de ambas guías se muestran en la Tabla 6 como oligonucleótidos, tal y como se solicitaron a Sigma-Aldrich para su síntesis.

3.19.2. Hibridación y clonaje de las secuencias guías en el vector pMLM3636

Para la hibridación de los oligonucleótidos (*Forward* y *Reverse* de cada guía), se mezclaron ambos en 100 µl de agua a una concentración de 10 µM cada uno. Se calentaron a 95°C durante

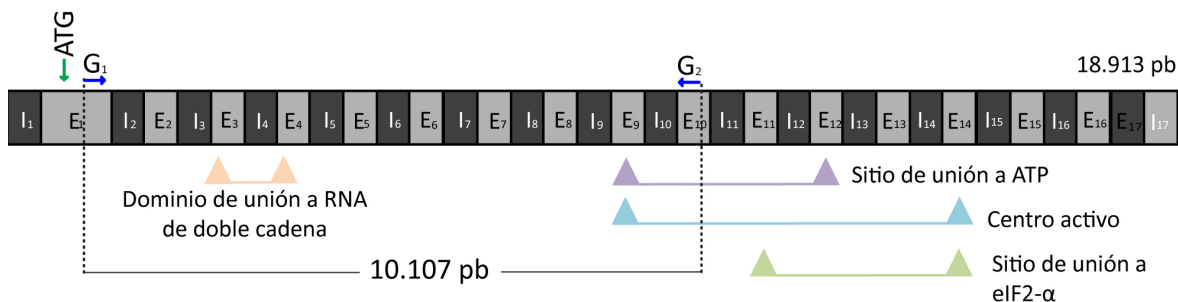


Figura 5. Estrategia para la obtención de células DF-1 que no expresen el gen *PKR* (DF-1-PKR) por la tecnología CRISPR/Cas9. Esquema del gen *PKR* de pollo (18.913 pb) donde se representan los intrones (cajas negras) y los exones (cajas grises). El tamaño de las cajas no es proporcional a la longitud de cada intrón o exón que constituye el gen en estudio. Las flechas azules indican la zona de reconocimiento de las guías de RNA y la zona aproximada de corte en el genoma por la enzima Cas9 (amarillo) (10.107 pb). La zona delimitada por las líneas punteadas indica la zona donde ocurriría la delección. La flecha verde indica el sitio de iniciación de la transcripción. Se indica la localización de las secuencias que codifican los dominios de la proteína PKR, que se encuentran delimitados por triángulos del mismo color.

5 minutos y se hibridaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. De esta reacción, se empleó 2 µl para la reacción de clonaje en el plásmido pMLM3636. La reacción de clonaje se realizó empleando

portadores de las guía a emplear, sembramos células DF-1 en placas de 24 pocillos, y se transfectaron con diferentes cantidades de cada uno de los plásmidos portadores de las guías, 1.000 ng de pCas9 y 100 ng de

Tabla 6. Secuencias de las guías CRISPR empleadas para deleccionar la región del gen chPKR que codifica para el dominio de unión a dsRNA.

Localización	Secuencias de las guías CRISPR (5´-3´)	% on-target
N-terminal	F: <u>ACACC</u> CAAGCTCGATTACGTCGACG <u>G</u>	99%
	R: AAAACCGTCGACGTAATCGAGCTTG <u>G</u>	
C-terminal	F: <u>ACACC</u> TAGTGCATATTATTGCAGC <u>G</u>	89%
	R: AAAACGCTGCAATAATATCGCACTA <u>G</u>	

Secuencia de las guías (verde). Secuencias necesarias para el clonaje de las guías en el pMLM3636 (subrayado). F: *forward*; R: *reverse*

el método *Golden Gate* (120), basado en las enzimas de restricción tipo IIS, utilizando la enzima *Esp3I*. De este modo, se emplearon 200 ng del plásmido pMLM3636, 2 µl de la reacción de hibridación, el tampón 2X *T4 DNA ligase*, 1 µl *T4 DNA ligase* (Promega), 1µl 20 mM DTT, 1µl *Esp3I* (*Thermo Scientific*) en un volumen final de 20µl. A continuación, la reacción se sometió a 10 ciclos de 10 minutos a 37°C, seguidos de otros 10 ciclos de 10 minutos a 16°C. Se transformaron bacterias *E. coli* competentes de la cepa DH5α con 2 µl de la reacción de ligación. Se aislaron varias colonias y se secuenciaron utilizando el cebador frente a la secuencia del promotor U6 (Tabla 6) para comprobar la secuencia de cada guía.

3.19.3. Transfección y clonaje celular en células DF-1

Para determinar la cantidad de los plásmidos

pEGFP-C1, empleado este último como control de transfección. Con las cantidades elegidas, se transfectaron los plásmidos en cuestión de manera proporcional en células DF-1 sembradas en placas de 100 mm a una confluencia del 80%. Tras 48 h, las células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS y 5 mM EDTA a una concentración de 5x10⁶ células/ml y sometidas a citometría de flujo empleando el citómetro BD FACSCalibur. De esta manera, las células fluorescentes eran separadas (*Cell sorting*) y recogidas para sembrarlas nuevamente en placas de 100 mm. Se sembraron a baja densidad para poder obtener colonias individuales. Al cabo de 7-10 días, se procedió al clonaje de las células empleando cilindros de clonación de 150 µl (Sigma-Aldrich), para determinar si alguna de ellas portaba la delección deseada. Una vez crecidos los diferentes clones, estos fueron analizados para comprobar la expresión

de la proteína PKR por *Western Blot*. Una vez comprobado la falta de expresión de PKR en algunos de los clones analizados, estos fueron posteriormente caracterizados genotípicamente para determinar la homocigosis o heterocigosis de la delección. Para ello, se recogieron células correspondientes a 4 clones seleccionados de entre aquellos que no expresaban la proteína PKR, y células DF-1 no transfectadas como control, y se incubaron con un tampón de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl

pH9, 0,45% Nonidet, 0,45% Tween-20, 0,5 mg/ml proteinasa K) a 56°C durante 2 horas y a 95°C durante 15 minutos. 1 µl de la reacción se sometió a PCR empleando la *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen).

Se emplearon un par de cebadores a ambos extremos de la delección y otro cebador interno a la misma (Tabla 7). Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Tabla 7. Secuencias de los cebadores empleados para la caracterización genotípica de los clones CRISPR y para la secuenciación del plásmido MLM3636.

Aplicación	Secuencia (5'-3')
Cebadores externos a la delección	F ₁ : GTGCATGGCCAAGATCAACAG
	R ₁ : TCACGAGACCAAAGTCACCAA
Cebador interno a la delección	R ₂ : TGAGGAGGGCTAGTAAACAGTAA
U6/secuenciación	F _{U6} : GACTATCATATGCTTACCGT

RESULTADOS

1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LÍNEA CELULAR HUMANA (HeLa)

1.1. IBDV ES SENSIBLE A LA ACCIÓN ANTIVIRAL DEL IFN-α EN CÉLULAS HeLa

Las células HeLa han sido utilizadas anteriormente para estudiar diferentes etapas del ciclo de vida de IBDV (33). Por ello, se emplearon dichas células para estudiar en primer lugar la sensibilidad de IBDV a la acción

blot. La ausencia de expresión de VP3 indica que 10 y 100 UI de IFN son suficientes para bloquear la replicación viral tras la infección con una MOI de 0,05 y 2, respectivamente (Fig. 6A). Además, en cultivos tratados con 100 UI/ml de IFN e infectados con 0,05 y 2 UFP/célula el título de virus en el medio extracelular experimenta una reducción de aproximadamente 20 y 65 veces, respectivamente (Fig. 6B). Por tanto, estos resultados señalan que IBDV es incapaz de

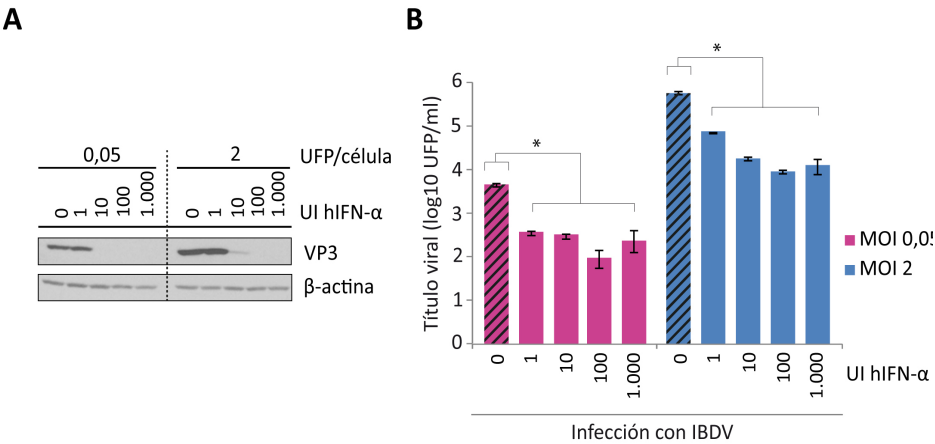


Figura 6. IBDV es sensible a la acción antiviral de IFN-α en células HeLa. Se pretrataron células HeLa con diferentes dosis de hIFN-α (1, 10, 100 y 1.000 UI/ml) durante 16 horas. Posteriormente, se infectaron las células con IBDV utilizando dos MOI, 0,05 y 2 UFP/célula. Los sobrenadantes y los extractos celulares fueron recogidos a las 24 h p.i. **A.** Análisis mediante *Western Blot* de los extractos celulares empleando un anticuerpo frente a la proteína viral VP3. La proteína β-actina se utilizó como control de carga. **B.** Titulación del virus extracelular en los sobrenadantes. Los datos se representan en escala logarítmica (log10). Barras de rayas: células sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media ± la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Los asteriscos (*) indican un p<0,05, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

antiviral del IFN-α. Estas células fueron tratadas con diferentes cantidades del IFNα humano (hIFN-α) (1-1.000 IU) durante 16 h previamente a la infección. Las células se infectaron a dos MOI, 0,05 y 2 UFP/célula, y fueron recogidas a las 24 h p.i. La capacidad de replicación del virus fue determinada mediante el análisis de la expresión de la proteína viral VP3 por Western

replicar en células donde la respuesta antiviral ha sido activada por IFN, como ya se había descrito previamente en otras líneas celulares (121).

1.2. EL TRATAMIENTO CON IFN-α EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS CON IBDV CAUSA APOPTOSIS

Para investigar el efecto del tratamiento con

IFN una vez que la infección se ha establecido, se realizaron un conjunto de experimentos en los que células HeLa no infectadas (Mock, M) o células infectadas a una MOI de 2 UFP/célula (I) fueron tratadas con 1.000 UI de IFN- α a 3, 6, 9 y 12 h p.i. (M+3, M+6, M+9 y M+12 e I+3, I+6, I+9 e I+12, respectivamente). Todas las muestras fueron recogidas a 24 h p.i. y analizadas mediante distintos ensayos como se detalla a continuación.

Las imágenes tomadas por microscopía de contraste de fases muestran que las células infectadas y tratadas con IFN presentan un fuerte efecto citopático, que no se observa en las células infectadas sin tratamiento con IFN, ni en las células no infectadas (M), tratadas o no con IFN (Fig. 7A). Este efecto citopático es más pronunciado en los cultivos tratados a tiempos tempranos p.i. (I+3 o I+6) que en los tratados a tiempos tardíos (I+9 o I+12). Para poder discriminar entre células vivas y muertas, se empleó un kit de imagen denominado *LIVE/DEAD® Cell Imaging Kit*, tomando las imágenes a 24 h p.i. Como muestra la Figura 7B, en los cultivos infectados y tratados con IFN se

observan células muertas, siendo mayor el número de estas cuando el IFN es añadido a 3 h p.i. que cuando se añade a 12 h p.i. Para determinar si este efecto citopático era debido a que las células estuvieran sufriendo un proceso de muerte por apoptosis, se decidió emplear dos aproximaciones para analizar la activación de las caspasas. Por un lado, se analizó la degradación de la polimerasa PARP, y por otro, se determinó la actividad de las caspasas 3 y 7 mediante un ensayo comercial. PARP es una proteína de 116 kDa implicada en la reparación de ADN, la cual es un sustrato de las caspasas 3 y 7 durante la apoptosis, por lo que se la considera como un marcador de este tipo de muerte celular (61). El corte de PARP origina dos fragmentos: un fragmento que corresponde al dominio C-terminal catalítico (89 kDa) y un fragmento N-terminal que corresponde al dominio de unión al DNA (122). Como se puede observar en la Figura 7C, las células infectadas presentan un ligero corte de PARP, similar al observado en las células no infectadas. Sin embargo, en las células infectadas y tratadas con IFN la degradación de PARP es mucho mayor en todas las muestras,

Figura 7. El tratamiento con IFN- α induce apoptosis en células HeLa infectadas con IBDV. Células HeLa no infectadas (M, Mock) o infectadas (I) con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con 1.000 UI/ml de hIFN- α a 3, 6, 9 y 12 h p.i. (M+3, M+6, M+9, M+12 e I+3, I+6, I+9 e I+12). Como control se utilizaron células no tratadas con IFN (-). A las 24 h p.i. las células se sometieron a diferentes análisis. **A.** Microscopía de contraste de fases. **B.** Microscopía de fluorescencia de células que fueron tratadas con el agente *LIVE/DEAD® Cell* para discriminar entre células vivas (verde) y muertas (rojo). **C.** Análisis de los extractos celulares mediante *Western Blot* empleando los siguientes anticuerpos: anti-PARP, -PKR total (PKR-t), -PKR fosforilada (Thr 446) (PKR-p), -eIF2 α total (eIF2 α -t), -eIF2 α fosforilada (Ser 52) (eIF2 α -p), -Mx, -ISG-56 y -VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. PARP-c (proteína PARP procesada). **D.** Determinación de apoptosis mediante el reactivo Caspase-Glo 3/7. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL). Los valores obtenidos fueron relativizados frente a los valores de las células no infectadas (Mock). **E.** Análisis por electroforesis en geles de agarosa del RNA ribosómico (rRNA). A la derecha de la figura se indica el tamaño de los rRNA (28S y 18S). Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

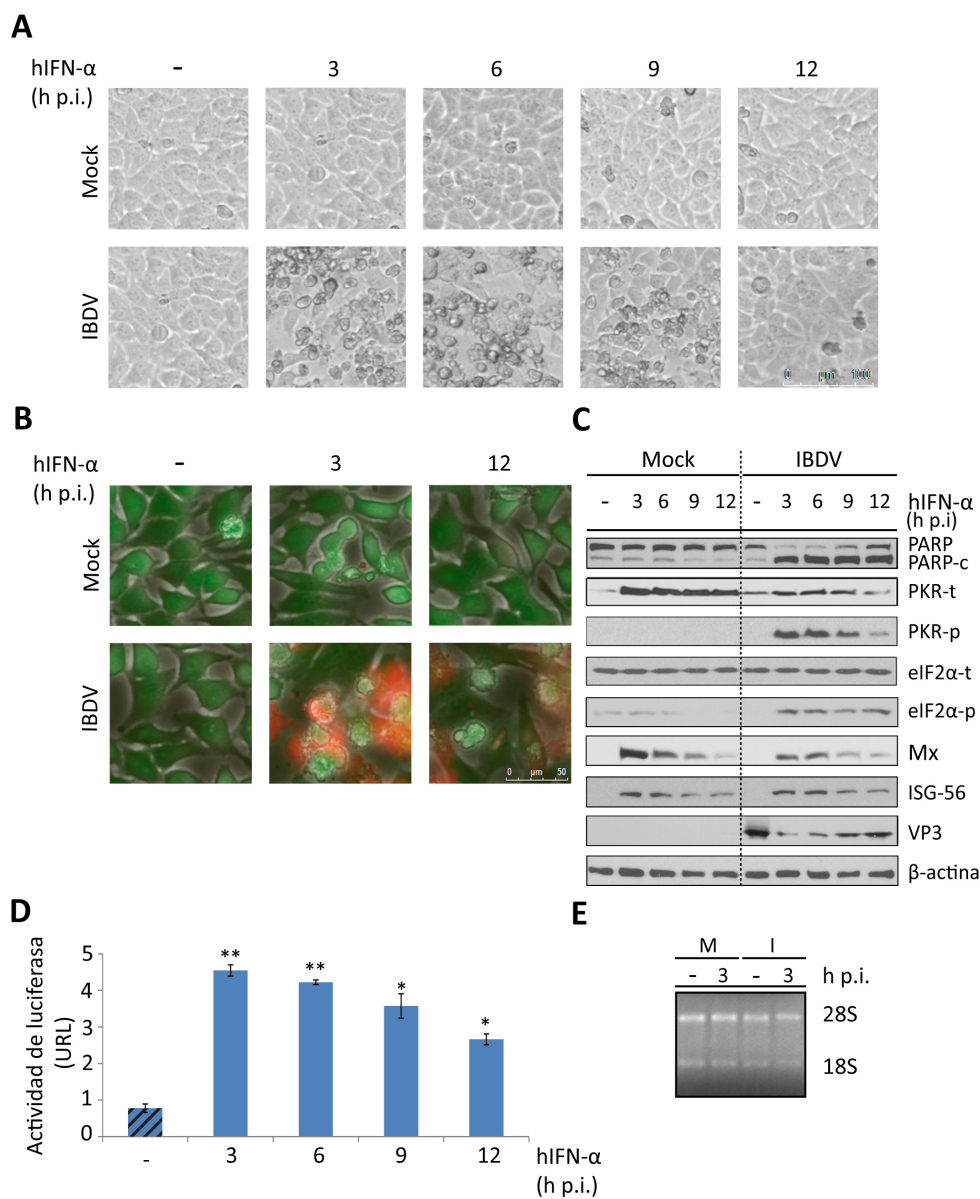


Figura 7

aunque se observan diferencias en la magnitud del corte, siendo mayor en las muestras I+3 o I+6. Posteriormente, se cuantificó la activación de la caspasa 3 y 7 con el kit *Caspase-Glo 3/7 assay kit* (Fig. 7D) que consiste en la utilización de un péptido que al ser procesado libera un sustrato de la enzima luciferasa. Los resultados

de este ensayo muestran de nuevo que en cultivos infectados sin tratamiento con IFN no se detecta prácticamente actividad de las caspasas. Por el contrario, en aquellas células infectadas y tratadas con IFN se observa la inducción de la respuesta apoptótica, y esta es mayor cuando el IFN es añadido a tiempos

tempranos p.i. (I+3 o I+6) que cuando es añadido a tiempos más tardíos (I+9 o I+12). Estos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con IFN- α en células infectadas causa su muerte por apoptosis.

A partir de estos resultados, como una primera aproximación para determinar los factores implicados en la inducción de la apoptosis observada, se quiso analizar el estado de los rRNA 28S y 18S para determinar si la enzima RNasaL podría ser responsable, o participar, en la apoptosis observada en células HeLa infectadas y tratadas con IFN- α . Esta nucleasa es activada por la unión al sustrato 2'-5' oligoadenilato (2-5A), producido por la proteína OAS, la cual se activa en presencia de dsRNA exógeno (123). Como se puede observar en la Figura 7E, no existe degradación alguna de los rRNA en cuestión, ni en aquellas muestras donde se ha observado una mayor actividad apoptótica (I+3), sugiriendo que la nucleasa RNasaL no participa en la apoptosis producida en células HeLa infectadas y tratadas con IFN- α .

Para profundizar en la caracterización del efecto del IFN sobre la infección producida por IBDV, se realizó un estudio de dosis-respuesta. Para ello, células Hela fueron infectadas a una MOI de 2 UFP/célula y tratadas a las 3 h p.i. (I+3) con diferentes cantidades de IFN- α , desde 1 UI hasta 10^5 UI. Las muestras fueron recogidas tras 24 h y analizadas mediante el ensayo de actividad de caspasas con el *Caspase-Glo 3/7 assay kit*. Se decidió emplear el tiempo de adición de IFN de 3 h p.i. debido a que a este tiempo de adición de

la citoquina se observa una mayor producción de apoptosis. Los resultados mostrados en la Figura 8 señalan tan solo un ligero aumento, no significativo, en la actividad de las caspasas en las muestras M+3, incluso cuando se emplean las mayores cantidades de IFN. Sin embargo, en las muestras infectadas el tratamiento con 100 UI de IFN- α provoca un gran aumento en la actividad de las caspasas analizadas. El tratamiento con cantidades mayores de IFN produce tan solo una ligera modificación en la actividad de las caspasas, razón por la cual se decidió emplear la cantidad de 1.000 UI de IFN- α en todos los experimentos con células humanas.

De estos resultados, se puede deducir que la infección por IBDV no causa, per se, apoptosis a 24 h p.i. Sin embargo, el tratamiento de células infectadas con IFN- α provoca un aumento significativo en la actividad de las caspasas. Este incremento es mayor cuando la citoquina es añadida en tiempos tempranos durante la infección. El hecho de que las células no infectadas tratadas con IFN (M+3) no produzcan un aumento en la actividad de las caspasas, indica que para la inducción de la apoptosis se requiere un factor o factores virales.

1.3. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE ISGS EN CÉLULAS INFECTADAS CON IBDV Y TRATADAS CON IFN- α

Para estudiar el efecto de la infección sobre las proteínas codificadas por genes inducidos por IFN, denominadas por sus siglas en inglés ISGs (*interferon stimulated genes*), se procedió a

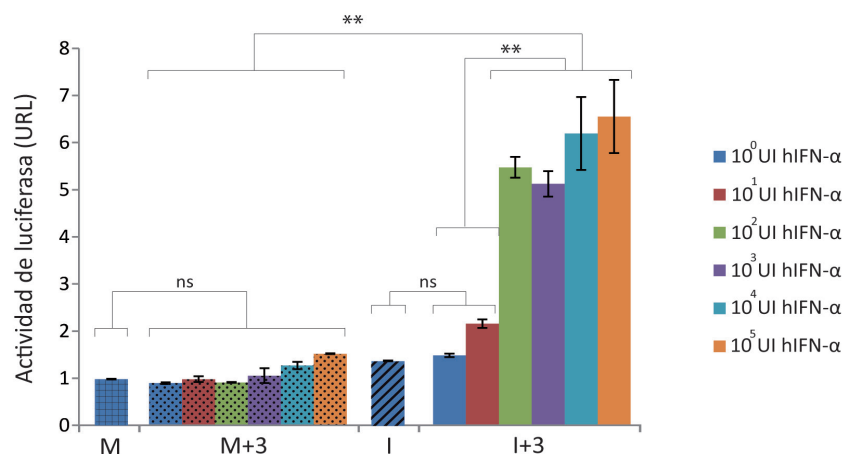


Figura 8. Estudio dosis-respuesta del IFN-α en la activación de la apoptosis en células infectadas por IBDV. Células HeLa infectadas con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas a 3 h p.i. con dosis crecientes de hIFN-α (desde 1 to 105 UI/ml). Las muestras fueron recogidas a las 24 h p.i. y la actividad apoptótica se analizó mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7 assay kit*. Barras con entramado cuadrícula: células Mock; barras punteadas: células Mock tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (**) indican un $p < 0,01$, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

analizar mediante *Western Blot* las muestras de células infectadas con IBDV y tratadas con IFN a diferentes tiempos p.i. En la Figura 7C se puede observar una reducción en la expresión de PKR en las células infectadas tratadas con IFN en comparación con las células M+3, indicando que IBDV inhibe parcialmente la expresión de esta proteína. Además, la fosforilación de PKR sólo ocurre en las células infectadas y tratadas con IFN, siendo mayor cuando el IFN es añadido a tiempos tempranos p.i. (I+3 o I+6). En concordancia, se observa la fosforilación de eIF2α en las muestras infectadas y tratadas con IFN. No obstante, la cantidad total de eIF2α (eIF2α-t) es similar en ambos casos, tanto en células sin infectar como en células infectadas, indicando que la infección no modifica el patrón

de expresión de esta proteína.

Por otro lado, el patrón de expresión de Mx e ISG-56 es similar en ambos casos, células sin infectar o infectadas, tratadas con IFN. Se puede observar que la acumulación de ambas proteínas es mayor cuando las células fueron tratadas a 3 y 6 h p.i., que cuando fueron tratadas a 9 y 12 h p.i. Con respecto a la infección viral, la proteína VP3 muestra una gran reducción en su expresión cuando el IFN es añadido a tiempos tempranos p.i. Este efecto es menor cuando la citoquina se añade a tiempos más tardíos, indicando que, aunque IBDV es sensible a la acción antiviral del IFN, una vez la infección se ha establecido, el virus expresa un factor o factores que contrarrestan la actividad de IFN.

1.4. PKR ES UNA PROTEÍNA CRUCIAL EN LA RUTA DE LA APOPTOSIS INDUCIDA EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS CON IBDV Y TRATADAS CON IFN- α

El papel de PKR en la producción de apoptosis ha sido demostrado ampliamente (124). Dado que se ha observado la fosforilación de PKR en las células infectadas y tratadas con IFN (Fig. 7C), se decidió realizar los mismos experimentos en células HeLa que no expresasen PKR (HeLa-PKR). Estas células fueron producidas en estudios previos del laboratorio por silenciamiento génico empleando un shRNA, mientras que las células control (HeLa-control) fueron generadas usando un shRNA control. Como se puede observar en la Figura 9A, el kit *LIVE/DEAD® Cell Imaging Kit* muestra una ligera mortalidad en células HeLa-PKR infectadas y tratadas con IFN a 3 y 12 h p.i. Por el contrario, en los cultivos de las células HeLa-control se observa una mayor mortalidad, similar a la observada en las células HeLa *wild type* (WT) (Fig. 7B). Nuevamente, se midió la actividad de las caspasas 3 y 7, siendo ésta drásticamente reducida en las células HeLa-PKR con respecto a las células control (Fig. 9B). Independientemente del tiempo p.i. al cual fue añadido el IFN, los niveles de actividad

de caspasas alcanzados en estas células fueron similares a los obtenidos en las células WT infectadas sin tratamiento con IFN. Sin embargo, podemos observar el mismo patrón de activación de las caspasas 3 y 7 entre las células control y las células WT, siendo más altos los valores de actividad de caspasas cuando el IFN es añadido a 3 o 6 h p.i, que cuando es añadido a tiempos más tardíos (I+9 o I+12). Por otro lado, la observación de la reducción de la respuesta apoptótica en las células HeLa-PKR se ve reforzada por los resultados obtenidos por *Western Blot* (Fig. 9C). Estos señalan claramente una disminución en el corte de PARP en células HeLa-PKR infectadas y tratadas con IFN con respecto a las células control o células WT (Fig. 7C) bajo el mismo tratamiento. Los bajos niveles de apoptosis en las células infectadas en ausencia del tratamiento con IFN en ambos tipos de células, HeLa-PKR y HeLa-control, al igual que en células HeLa WT, refuerzan la idea de que IBDV no produce por sí mismo apoptosis en células HeLa a 24 h p.i.

Del mismo modo, se analizó el patrón de expresión de ISGs en estas células (Fig. 9C). La expresión de las diferentes proteínas analizadas

Figura 9. La apoptosis inducida en células infectadas por IBDV y tratadas con IFN- α es dependiente de la expresión de PKR. Células HeLa control o células HeLa que tienen silenciada la expresión de PKR (HeLa-PKR-silenciada) no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 UI/ml de IFN α a 3, 6, 9 o 12 h p.i. (M+3, M+6, M+9, M+12 e I+3, I+6, I+9 e I+12). Como control se utilizaron células no tratadas con IFN (-). A las 24 h p.i. las células se sometieron a diferentes análisis. **A.** Microscopía de fluorescencia de células que fueron tratadas con el agente LIVE/DEAD® Cell para discriminar entre células vivas (verde) y muertas (rojo). **B.** Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7* en las células HeLa control (barras azules) y en las HeLa-PKR (barras rosas). La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. **C.** Análisis de los extractos celulares mediante *Western Blot* empleando los siguientes anticuerpos: anti-PARP, -PKR total (PKR-t), -PKR fosforilada (Thr 446) (PKR-p), -eIF2 α total (eIF2 α -t), -eIF2 α fosforilada (Ser 52) (eIF2 α -p), -Mx y -VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. PARP-c (proteína PARP procesada).

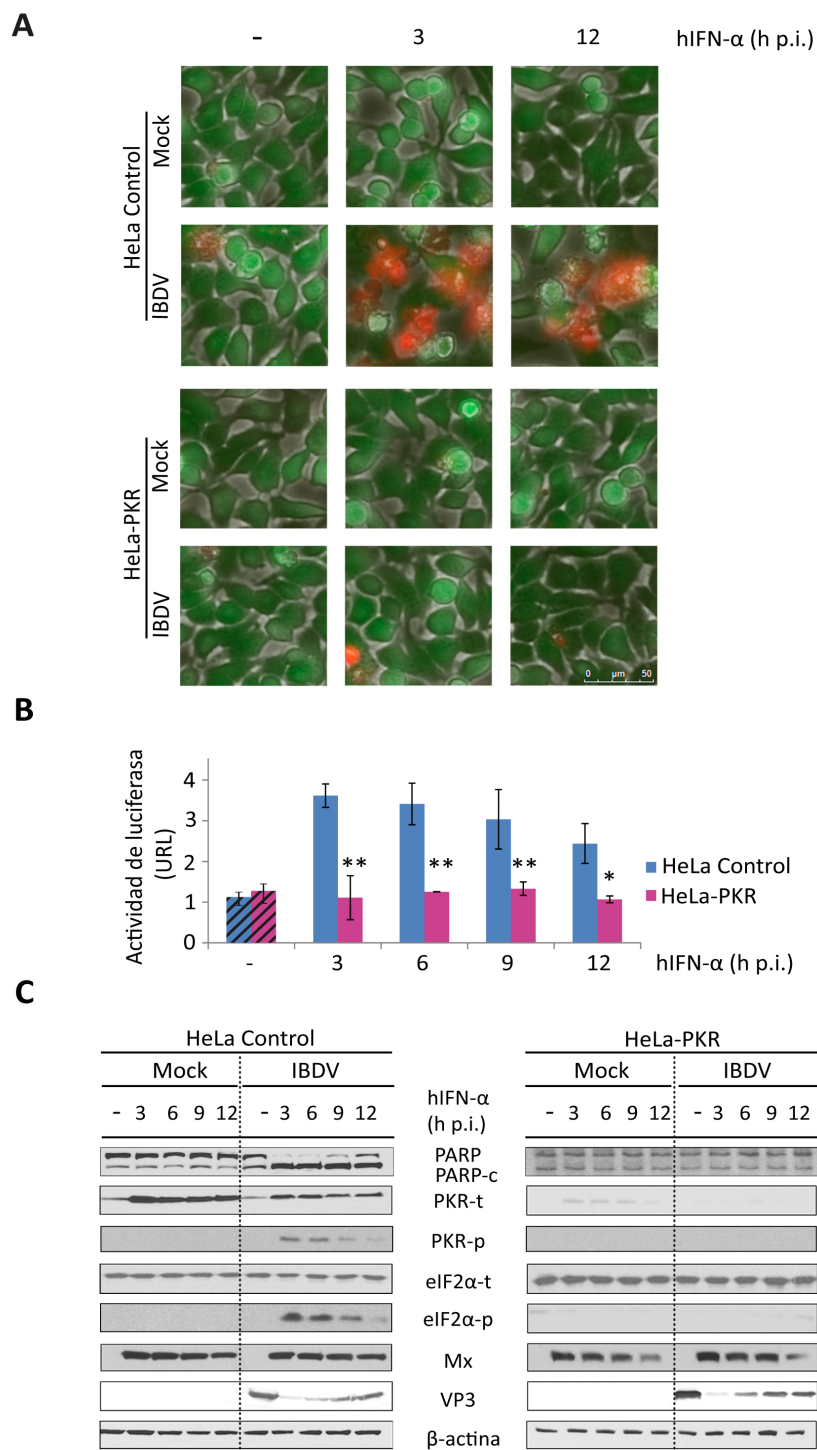


Figura 9

en las células HeLa-control muestra un patrón parecido al observado en las células HeLa WT. Como era de esperar, no se observa expresión de PKR en las células HeLa-PKR, y tampoco se observa fosforilación de eIF2 α . Este resultado indica que PKR es la proteína responsable de la fosforilación de eIF2 α en las células HeLa, bajo las condiciones estudiadas. Tras el tratamiento con IFN, se observa una expresión similar de *Mx* entre las muestras de células infectadas y no infectadas, tanto en las células HeLa-PKR como en las células control, que depende del tiempo p.i. al que se ha añadido el IFN. Estos resultados señalan que ni la infección altera la expresión de esta proteína, ni PKR regula su expresión en estos experimentos. Además, el silenciamiento de PKR en las células HeLa no revierte el bloqueo de la expresión de VP3 por el tratamiento con IFN.

1.5. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *IFNB* Y *TNFA* EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS Y TRATADAS CON IFN- α DEPENDIENTE DE PKR

Para ahondar aún más en la respuesta celular producida por la infección con IBDV seguida del tratamiento con IFN, se estudió por qRT-PCR la expresión de varios genes relacionados con la respuesta a IFN y con la inducción de apoptosis.

De este modo, se recogieron muestras M, M+3, I e I+3 de células HeLa-control y HeLa-PKR. Todas las muestras fueron recogidas a las 24 h p.i.

En las células control se observó una inducción significativa de *IFNB* de alrededor de 2 unidades logarítmicas en las muestras I+3 con respecto a las muestras M o M+3 (Fig. 10). Claramente, la inducción fue significativamente más baja en las células HeLa-PKR infectadas y tratadas bajo las mismas condiciones. Sin embargo, la expresión de los genes *Mx*, *ISG-15* e *ISG-56* inducida por el tratamiento con IFN, fue similar en las células no infectadas (M+3) o infectadas con IBDV (I+3). Por otro lado, en las células HeLa-PKR la expresión de *ISG-15* fue reducida bajo todas las diferentes condiciones empleadas, a diferencia de la inducción de *ISG-56* y *Mx*, cuya expresión se mantuvo similar en las muestras M+3 e I+3 entre ambas líneas, y aumentó en una unidad logarítmica en las células HeLa-PKR infectadas con respecto a las células HeLa-control.

A continuación, se analizó el patrón de expresión de diferentes genes relacionados con el proceso de apoptosis, específicamente *BAK*, *FAS*, *TRAIL*, *TNFA* y *BCL2*, para poder determinar qué factor podría estar involucrado en la inducción de

Figura 10. La inducción de los genes *IFNB* y *TNFA* en células infectadas por IBDV y tratadas con IFN- α es dependiente de la expresión de PKR. Células HeLa control y células HeLa-PKR no infectadas (M) o infectadas (I) a una de MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con 1.000 UI/ml de IFN a 3 h p.i. (M+3 e I+3). Las muestras fueron recogidas a las 24 h p.i. y sometidas a extracción de RNA total para su estudio por qRT-PCR. La expresión de cada gen celular fue normalizada respecto al gen *HPRT*. Los datos se presentan en escala logarítmica (log10) como número de veces sobre el nivel de expresión en las células Mock. Células HeLa control (barras azules) y células HeLa-PKR (barras rosas). Barras punteadas: células Mock tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*), (**) y (***) indican un $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

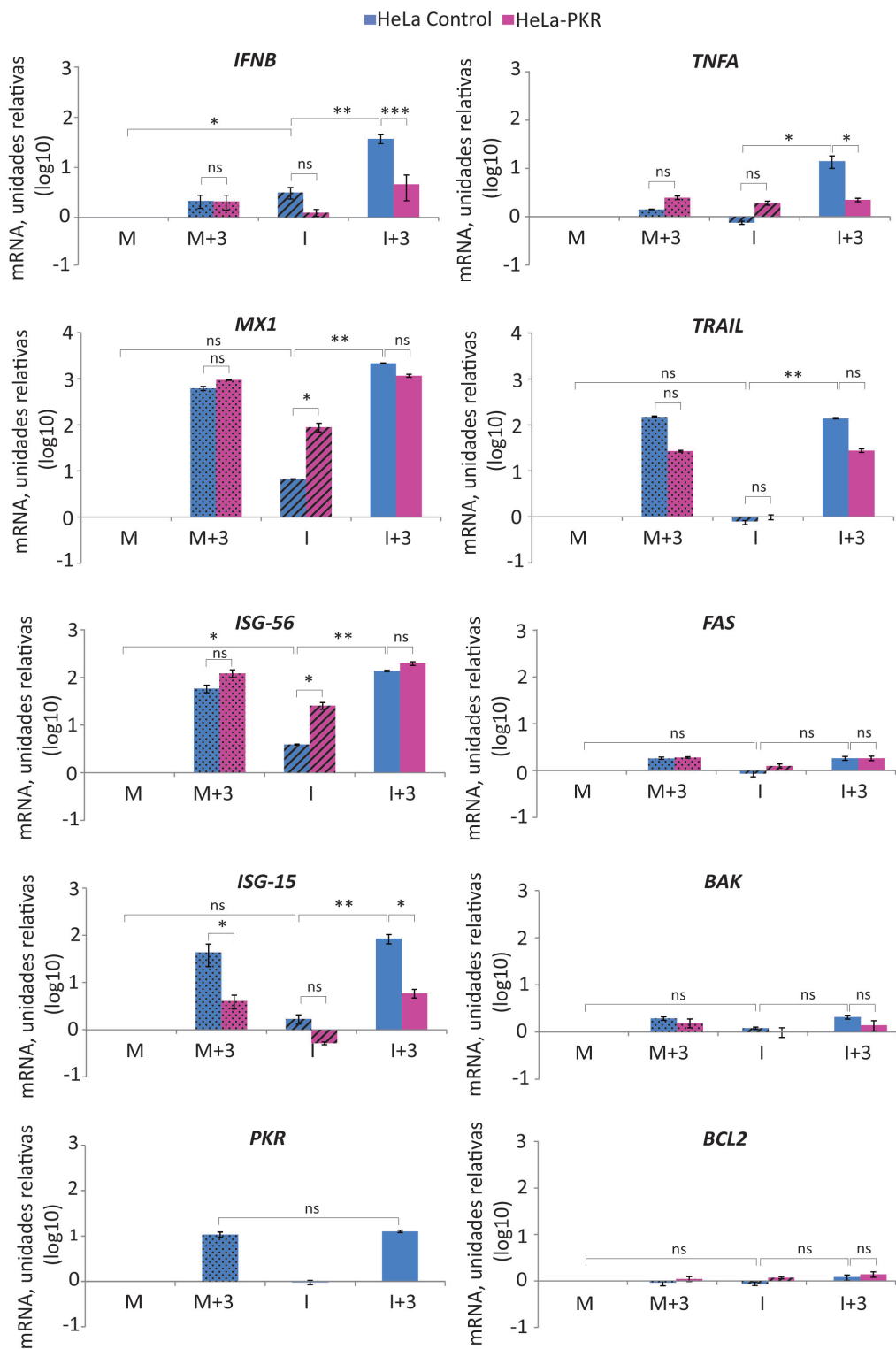


Figura 10

la apoptosis. Como muestra la Figura 10, se observa una inducción significativa de *TNFA* en las muestras I+3 de las células control. Sin embargo, en las células HeLa-PKR *TNFA* se mantuvo en niveles similares a los observados en las muestras M o M+3 (Fig. 10). Por el contrario, la expresión de *TRAIL* fue claramente inducida en las muestras M+3 e I+3 procedentes de ambos tipos de células, mientras que *BAK* y *FAS* mostraron solo un ligero incremento tras tratamiento con IFN. La expresión del gen anti-apoptótico *BCL2* se mantuvo prácticamente invariable bajo las diferentes condiciones.

Por otro lado, se analizó la replicación del RNA viral por qRT-PCR con cebadores que hibridan en el segmento A, en la zona correspondiente

a la secuencia que codifica VP3 (Fig. 11A). En las células tratadas con IFN (I+3) se observa una reducción de alrededor de una unidad logarítmica en los niveles de RNA viral con respecto a las células simplemente infectadas (I). Sin embargo, al igual que se observa en la Figura 9C, donde se analiza la acumulación de VP3, la ausencia de expresión de PKR no afecta significativamente a la replicación viral, ni en presencia ni en ausencia de IFN. Esto podría indicar que otra proteína, distinta a PKR, podría ser la responsable de bloquear la progresión de la infección a nivel de la replicación viral, cuando las células son tratadas con IFN. Sin embargo, cuando se analizan los sobrenadantes de las muestras I e I+3 (Fig. 11B), se observa una reducción del título viral de más de una

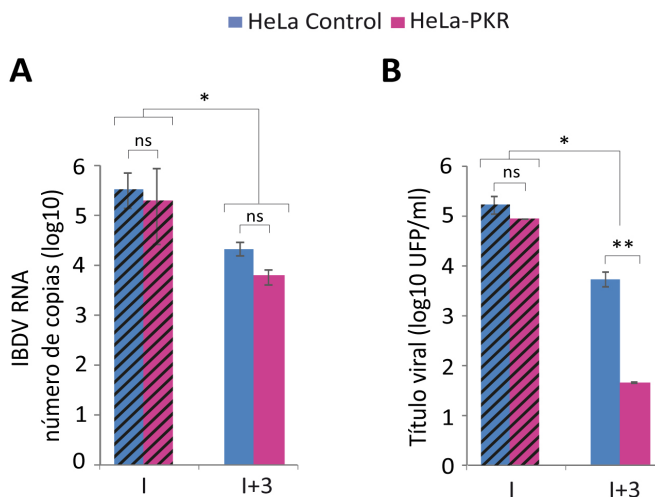


Figura 11. PKR no es la responsable de bloquear la progresión de la infección de IBDV en células infectadas y tratadas con IFN- α . Células HeLa control y células HeLa-PKR no infectadas (M) o infectadas (I) a una de MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con 1.000 UI/ml de IFN a 3 h p.i. (M+3 e I+3). Las muestras fueron recogidas a las 24 h p.i. **A.** Análisis del RNA viral por qRT-PCR empleando cebadores que hibridan en el segmento genómico A, en la zona que codifica la proteína VP3. **B.** Titulación del virus extracelular en los sobrenadantes. Los datos se representan en escala logarítmica (log10). Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

unidad logarítmica en las muestras tratadas con IFN, pero además, en ausencia de PKR el tratamiento con IFN produce una reducción adicional de aproximadamente 2 logaritmos, indicando que PKR podría mediar de alguna manera la salida de la progenie viral bajo estas condiciones.

1.6. LA APOPTOSIS INDUCIDA EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS CON IBDV Y TRATADAS CON IFN- α DEPENDE DE LA EXPRESIÓN DE TNF- α

Para determinar el papel de TNF- α en la producción de apoptosis observada en las muestras I+3, se decidió silenciar la expresión de esta proteína. De esta manera, se generaron partículas lentivirales que expresaban cinco diferentes shRNA. El silenciamiento fue verificado por qRT-PCR a 4 y 12 h días post transducción (d p.t.) en células que fueron transfectadas con poly (I:C) durante 16 h. Esto se hizo para conseguir la inducción del gen de *TNFA*, ya que los niveles basales del RNA mensajero en las células no transfectadas fueron indetectables (Fig. 12A y B, respectivamente). A los 12 d p.t. se consiguió reducir los niveles de expresión de *TNFA* hasta un 81% y 79% en células transducidas con lentivirus que portaban los shRNA TNF- α 1 y 4 (sh1 y sh4), respectivamente (Fig. 12B). Los otros tres shRNAs redujeron la expresión de *TNFA* alrededor del 50%, por lo que fueron descartados. A continuación, se realizó un ensayo biológico midiendo la actividad de las caspasas 3 y 7 en células transducidas con los lentivirus seleccionados, sh1 y sh4, para determinar el papel potencial de

TNF- α en la inducción de la apoptosis (Fig. 12C). Para ello, se infectaron con IBDV (MOI 2 UFP/célula) células HeLa transducidas con sh1, sh4 o shC a 12 d p.t., se trataron con hIFN- α (1.000 IU/ml) a 3 h p.i., y todas las muestras fueron recogidas a 24 h p.i. Como se indica en la Figura 12C, en las células silenciadas para la expresión de TNF- α , el tratamiento con IFN después de la infección con IBDV causa niveles de apoptosis muy inferiores a los observados en las células transducidas con un lentivirus control. Además, esta reducción es mayor en las células HeLa sh4 respecto a las células sh1, siendo del 76% y 57%, respectivamente (Fig. 12C). Por ese motivo, para la realización de los siguientes experimentos utilizamos las células HeLa sh4. Para confirmar este resultado, se analizó el patrón de corte de PARP en las células HeLa sh4 y en las HeLa shC tras la infección y el tratamiento con IFN. Como se puede observar en la Figura 12D, mientras que el procesamiento de PARP es evidente en las muestras I+3 de las células HeLa shC, en las células HeLa sh4 el patrón de PARP es similar en todas las muestras, independientemente de la infección y del tratamiento con IFN. Estos resultados indican que TNF- α , al igual que PKR, es un factor importante en la inducción de apoptosis en células HeLa infectadas por IBDV y tratadas con IFN.

1.7. ACTIVACIÓN DE NF- κ B EN CÉLULAS INFECTADAS CON IBDV Y TRATADAS CON IFN- α

El papel de PKR en la activación de NF- κ B mediante la fosforilación del inhibidor de este factor transcripcional, I κ B, que conduce

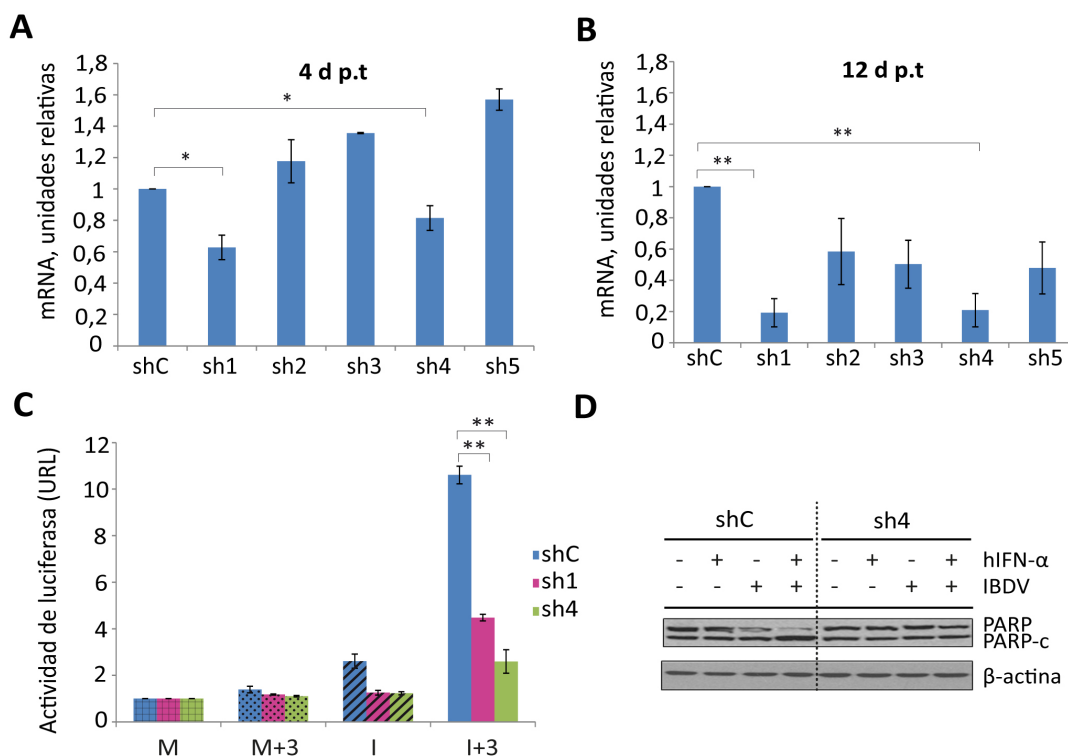


Figura 12. El silenciamiento de TNF- α reduce la apoptosis en células infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α . **A y B.** Se transdujeron células HeLa con vectores lentivirales que expresaban shRNAs (sh1-sh5) específicos frente al mRNA de TNF- α y con un shRNA control (shC). A los 4 d p.t. (**A**) y 12 d p.t. (**B**) las células fueron transfectadas con poly (I:C) durante 16 h para inducir la expresión del gen *TNFA*, y posteriormente se analizó su expresión por qRT-PCR. Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los valores del gen *HPRT*. Los datos se muestran como número de veces sobre el nivel de expresión en células no transducidas transfectadas con poly (I:C). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. **C y D.** Efecto del silenciamiento de TNF- α sobre la apoptosis. Se transdujeron células HeLa con vectores lentivirales que expresaban los shRNAs shC, sh1 y sh4. A los 12 d p.t. las células fueron infectadas (MOI 2 UFP/célula) y tratadas o no con 1.000 UI/ml de IFN a las 3 h p.i. Las células fueron recogidas a las 24 h p.i. **C.** Determinación de apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. **D.** Análisis mediante *Western Blot* del patrón de degradación de PARP. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. PARP-c (proteína PARP procesada). Barras con entramado cuadrícula: células no infectadas (Mock); barras punteadas: células no infectadas tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

a su degradación por el proteosoma, ha sido previamente descrito (56, 125). Por otro lado, la unión de TNF- α a su receptor induce apoptosis y la translocación nuclear de NF- κ B (126). Los resultados descritos en los párrafos anteriores indican que estas dos

moléculas, PKR y TNF- α , desempeñan un papel importante en la inducción de apoptosis en las células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN. Por tal motivo, se decidió analizar la activación de NF- κ B a diferentes tiempos p.i. tras la adición de IFN- α . Con este objetivo,

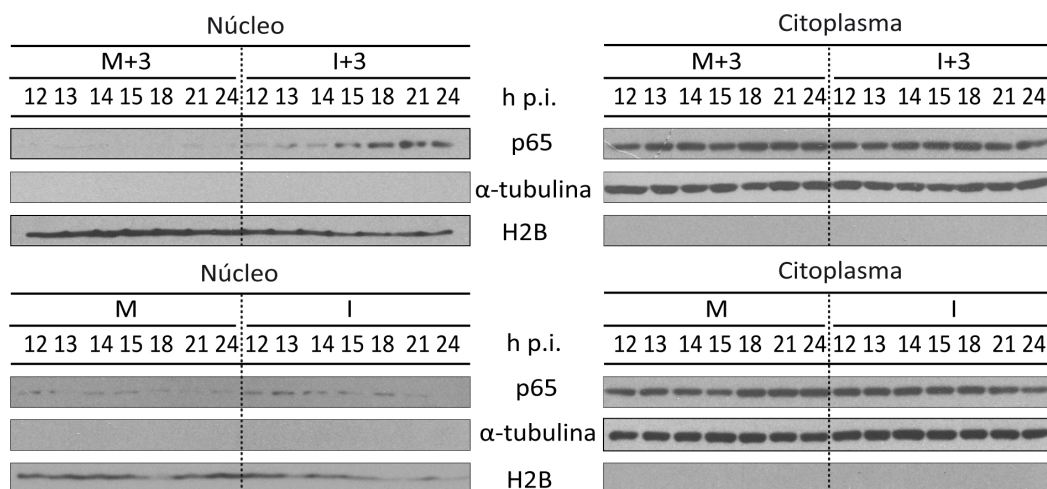


Figura 13. Activación de NF-κB tras tratamiento con IFN-α en células HeLa infectadas con IBDV. Células HeLa no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con 1.000 UI/ml de hIFN-α a 3 h p.i. (M+3 e I+3). A los tiempos indicados las células fueron sometidas a un fraccionamiento celular, y se analizó la translocación al núcleo de NF-κB por *Western Blot* empleando un anticuerpo contra la subunidad p65 de esta proteína. Como controles de carga citoplasmático y nuclear se emplearon las proteínas α-tubulina y la histona H2B, respectivamente.

las células fueron infectadas y tratadas con IFN a las 3 h p.i. Posteriormente, las células fueron recogidas a intervalos de 1 h desde las 12 h p.i. hasta las 15 h p.i., y a intervalos de 3 h desde las 15 h p.i. hasta las 24 h p.i. Las células se sometieron a un fraccionamiento celular, obteniendo por un lado la fracción nuclear y por otro la fracción citoplasmática. Se analizó la presencia de la subunidad p65 de NF-κB en ambas fracciones mediante *Western Blot*. Se analizaron las proteínas α-tubulina e histona H2B como marcadores citoplasmático y nuclear, respectivamente. La Figura 13 muestra los resultados obtenidos de muestras recogidas a 12, 13, 14, 15, 18, 21 y 24 h p.i. Como se puede observar en las muestras I+3, existe una activación transitoria de NF-κB a tiempos tardíos, entre las 15 y 22 h p.i., dada la presencia de p65 en la fracción nuclear. Por

otro lado, en las células no infectadas y en las células infectadas no tratadas con IFN, no se observa la translocación al núcleo de p65. En la fracción citoplasmática los niveles de p65 se mantienen invariables independiente de la presencia de IFN.

1.8. LA ACTIVACIÓN DE NF-κB ES ESENCIAL EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Para poder estudiar la contribución de NF-κB en la producción de apoptosis se empleó el reactivo MG132, que es un inhibidor del proteosoma y de NF-κB. Este inhibidor bloquea la actividad proteolítica del proteosoma sobre proteínas ubiquitinizadas. De esta forma, la degradación IκB no puede llevarse a cabo, permaneciendo NF-κB inactivo (127, 128). En primer lugar, se realizó un ensayo de

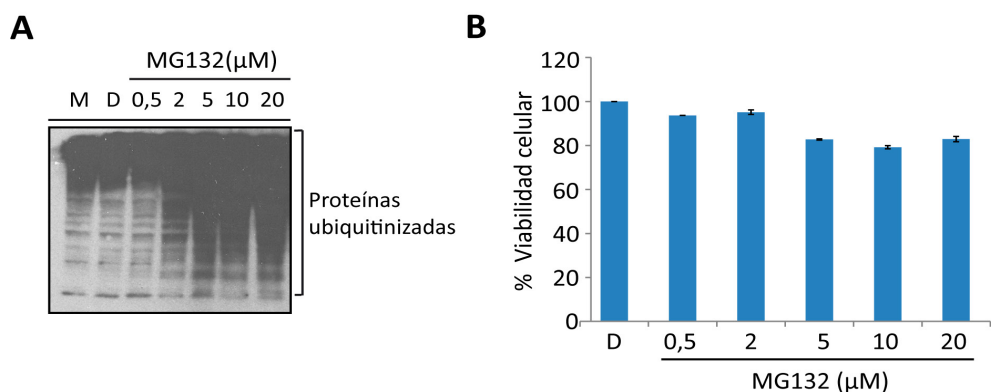


Figura 14. Ensayo de dosis-respuesta del inhibidor MG132 sobre la actividad del proteosoma y la viabilidad celular. Se trataron células HeLa con las concentraciones de MG132 que se indican o con DMSO durante 24 h. **A.** Análisis por *Western Blot* del estado de ubiquitinación de las proteínas celulares. (M): células no tratadas (Mock), (D): células tratadas con DMSO como control. **B.** Análisis de la viabilidad celular empleando el agente MTT. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes.

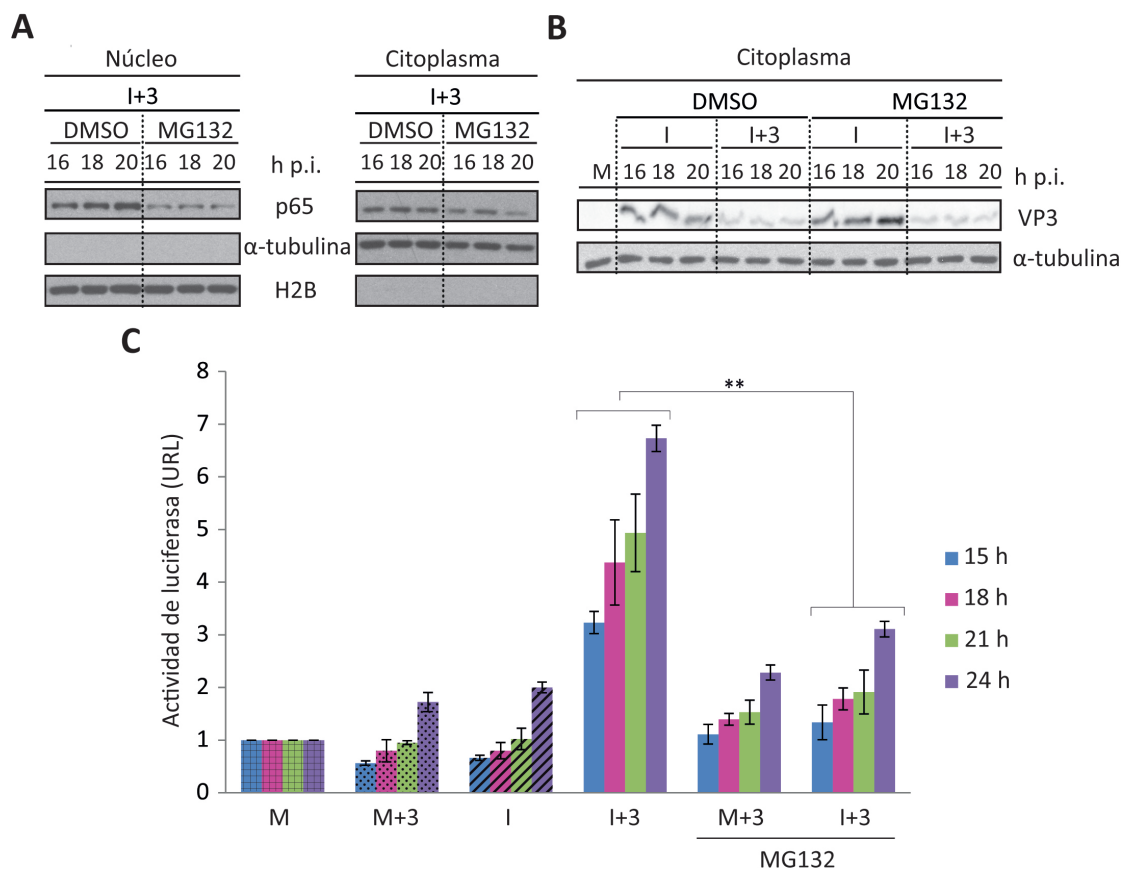


Figura 15

Figura 15. La inhibición de la translocación de p65 por el tratamiento con MG132 previene la apoptosis en células infectadas por IBDV y tratadas con IFN- α . Células HeLa no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas tras la hora de adsorción del virus con MG132 (2 μ M) o DMSO (usado como control). A las 3 h p.i. las células fueron tratadas con 1.000 UI/ml de IFN (M+3 e I+3). Las células fueron recogidas a los tiempos indicados y sometidas a un fraccionamiento celular. **A.** Análisis por *Western Blot* de las fracciones nuclear y citoplasmática empleando el anticuerpo contra una de la subunidad p65 de NF- κ B. Como controles de carga citoplasmático y nuclear se emplearon las proteínas α -tubulina y la histona H2B, respectivamente. **B.** Análisis por *Western Blot* de la fracción citoplasmática empleando el anticuerpo contra la proteína viral VP3. La proteína α -tubulina se utilizó como control de carga. **C.** Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Barras con entramado cuadrícula: células no infectadas (Mock); barras punteadas: células no infectadas tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (**) indican un $p < 0,01$, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

dosis-respuesta para comprobar el efecto de MG132 sobre la actividad del proteosoma y sobre la viabilidad celular, ya que, según la literatura, los inhibidores del proteosoma producen una pérdida de la viabilidad celular (127). Se seleccionó la concentración de 2 μ M debido a que con esta concentración se consiguió una mayor acumulación de proteínas ubiquitinizadas sin tener un efecto significativo sobre la viabilidad celular (<5%) (Fig. 14A y 14B, respectivamente).

A continuación, se infectaron células HeLa con IBDV y se trataron con IFN- α (1.000 UI/ml) a las 3 h p.i. en presencia de MG132, o DMSO como control. Las células fueron recogidas a las 16, 18 y 20 h p.i., dado que se había observado activación de NF- κ B a estos tiempos (ver Fig. 13). Nuevamente, las células infectadas se sometieron a fraccionamiento celular y se analizaron por *Western Blot*. Se observa una drástica reducción en la translocación de NF- κ B al núcleo tras el tratamiento con MG132 (Fig. 15A), con respecto a lo que ocurre tras el tratamiento con el solvente DMSO. La Figura 15B muestra que la expresión de la proteína

viral VP3 no se ve alterada en presencia del inhibidor MG132. Para evaluar el papel de NF- κ B en la producción de la apoptosis se analizó la actividad de las caspasas 3 y 7 en las células tratadas con MG132. Para ello, se infectaron células HeLa con IBDV, y se trataron con IFN- α a las 3 h p.i. en presencia o ausencia de MG132, y se recogieron a las 15, 18, 21 y 24 h p.i. Como indica la Figura 15C, se observa una importante reducción en la actividad de las caspasas en las muestras I+3 en presencia de MG132, con respecto a sus homólogas sin el inhibidor. Estos resultados indican claramente que NF- κ B participa en la producción de apoptosis en células infectadas con IBDV y tratadas con IFN.

1.9. MAVS E IFN- β NO DESEMPEÑAN UN PAPEL IMPORTANTE EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA APOPTOSIS

El papel de MAVS en la producción de IFN tipo I ha sido ampliamente descrito en la bibliografía. La activación de esta proteína adaptadora resulta de la interacción con los sensores citoplasmáticos RIG-I y MDA-5, los cuales son

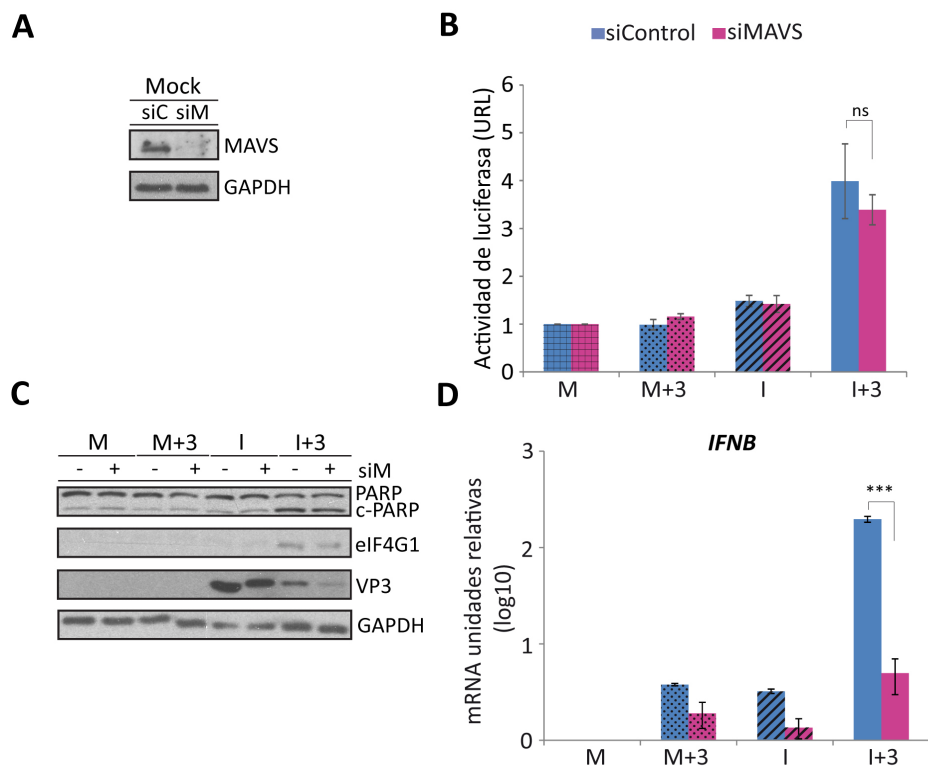


Figura 16. MAVS e IFN- β no parecen contribuir a la apoptosis producida en células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α . Se transfectaron células HeLa con un RNA de interferencia que silencia la expresión de la proteína MAVS (siM) o con un RNA de interferencia control (siC). Después de 72 h p.t. las células fueron infectadas (I) o no (M) con IBDV (MOI 2 UFP/célula), tratadas con 1.000 UI/ml de IFN α a 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a 24 h p.i. **A.** Los extractos celulares fueron analizados por *Western Blot* empleando un anticuerpo contra la proteína MAVS. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. **B.** Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. **C.** Análisis por *Western Blot* empleando los siguientes anticuerpos: -PARP, -eIF4G1, -VP3 y -GAPDH. Esta última se utilizó como control de carga. PARP-c (proteína PARP procesada). **D.** Análisis por qRT-PCR de la expresión del gen de *IFNB*. La expresión del gen de *IFNB* fue normalizada respecto al gen *HPRT* y los valores fueron representados como número de veces sobre el nivel de expresión en las células no infectadas. Los datos se presentan en escala logarítmica (log10). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Barras con entramado cuadrícula: células Mock; barras punteadas: células Mock tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (***) indican $p < 0,001$ determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

capaces de reconocer RNA viral, conduciendo a la activación de la respuesta innata (129). Además, se ha descrito que MAVS puede estar involucrada en la inducción de apoptosis (130). Por tales motivos, se quiso investigar el papel de MAVS en la respuesta apoptótica producida

en células HeLa. Para ello, transfectamos células HeLa con un RNA silenciador específico para MAVS (siM) y con un RNA silenciador control (siC). A las 72 h p.t., las células fueron infectadas con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula, tratadas con IFN- α (1.000 UI/ml) a 3 h p.i. y

recogidas a 24 h p.i. Las muestras M, M+3, I e I+3 fueron sometidas a diferentes análisis. La Figura 16A muestra el éxito del silenciamiento de la proteína MAVS, consiguiéndose una gran reducción en su expresión. Claramente, el silenciamiento de la expresión de MAVS no conduce a una reducción significativa en la actividad de las caspasas 3 y 7, como se puede observar en la Fig. 16B al comparar las muestras I+3 provenientes de células tratadas con el siM con las muestras transfectadas con el siC. Del mismo modo, no se observa una reducción en el corte de PARP en las muestras I+3 (Fig. 16C) en las células tratadas con siM. Para confirmar estos resultados, se analizó además el patrón de corte de la proteína eIF4G1. Esta proteína es degradada por la caspasa 3, generando un fragmento de 76 kDa y dos fragmentos de 50 kDa (63), por lo que el análisis de su patrón de degradación puede ser considerado también como marcador de apoptosis. Se puede observar la presencia del fragmento de 50 kDa en las muestras I+3, tanto en las que provienen de células transfectadas con siC como de las transfectadas con siM, lo que indica una misma actividad apoptótica. Sin embargo, cuando analizamos la expresión del gen *IFNB*, observamos que esta se ve drásticamente reducida en las muestras I+3 de las células tratadas con siM. Estos resultados indican que la activación de MAVS no desempeña un papel importante en la producción de apoptosis. Además, parece ser que la inducción de *IFNB*, que es dependiente de MAVS, no contribuye a la apoptosis desencadenada bajo el tratamiento con hIFN- α en células infectadas.

1.10. LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS AUMENTA A LO LARGO DE LA INFECCIÓN CON IBDV EN CÉLULAS TRATADAS CON IFN- α Y SE CORRELACIONA CON LA FOSFORILACIÓN DE PKR Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *IFNB*

Para determinar el mecanismo que subyace a la inducción de apoptosis en las muestras infectadas y tratadas con IFN, analizamos muestras a distintos tiempos p.i. Para ello, infectamos células HeLa a una MOI de 2 UFP/célula, las tratamos con 1.000 UI/ml de IFN- α a 3 h p.i., y se recogieron muestras a intervalos de 3 h desde las 12 h p.i. hasta las 24 h p.i. En primer lugar, se analizó el procesamiento de PARP. La Figura 17A muestra un incremento progresivo en la degradación de PARP en las muestras I+3, siendo claramente mayor a 24 h p.i. Sin embargo, las muestras de las células infectadas en ausencia de tratamiento con IFN muestran un ligero corte de PARP a tiempos tardíos (21 y 24 h p.i.). Se puede observar una banda prácticamente imperceptible correspondiente a la forma procesada de PARP en las muestras M y M+3. Además, se analizó la activación de las caspasas 3 y 7, observándose el mismo patrón ascendente y gradual únicamente en las muestras I+3 a lo largo del tiempo p.i. (Fig. 17B).

Cuando se analiza la fosforilación de PKR (Fig. 17A), se puede distinguir la ausencia de la misma en las células infectadas con IBDV (I) en cualquiera de los tiempos ensayados, al igual que en las células no infectadas (M). Sin embargo, en las muestras I+3 se observa un

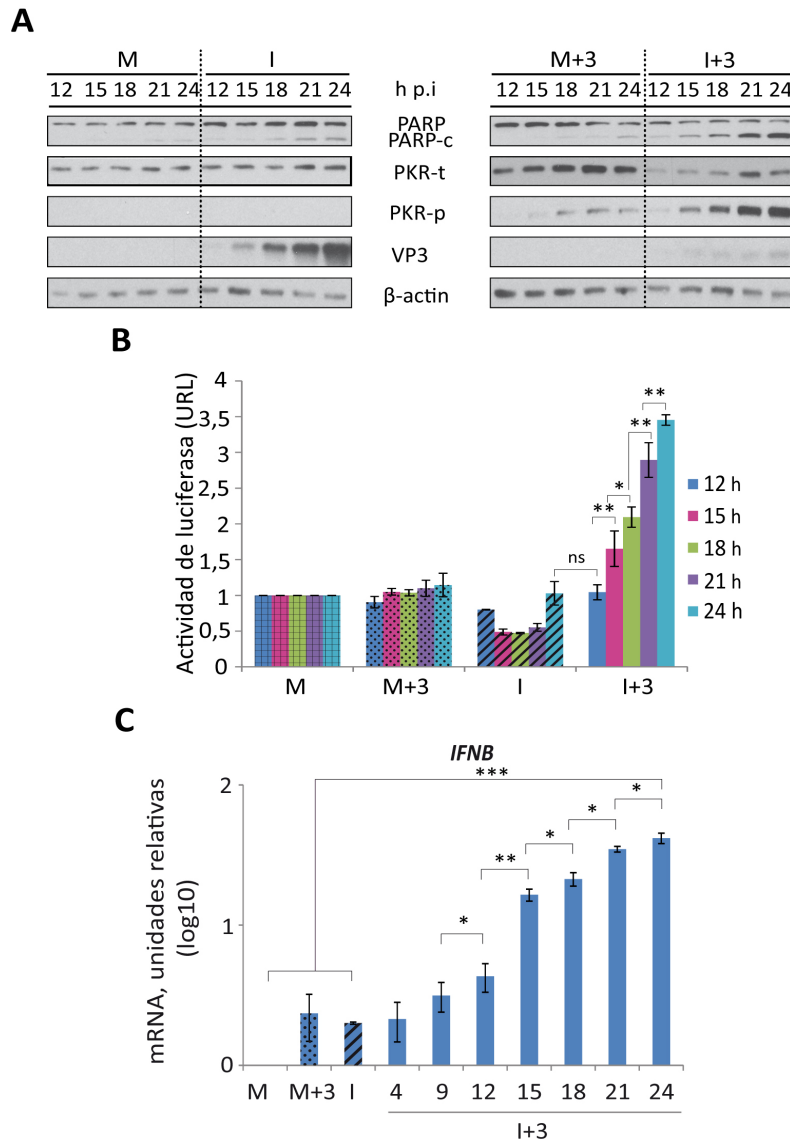


Figura 17. La apoptosis desencadenada en células infectadas por IBDV y tratadas con IFN- α se relaciona directamente con fosforilación de PKR y la expresión de *IFNB*. Células HeLa no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con 1.000 UI/ml de hIFN- α a 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a los tiempos indicados. **A.** Los extractos celulares fueron analizados por *Western Blot* empleando los siguientes anticuerpos: anti-PARP, -PKR total (PKR-t), -PKR fosforilada (Thr 446) (PKR-p) y -VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. PARP-c (proteína PARP procesada). **B.** Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. **C.** Análisis por qRT-PCR. La expresión del gen *IFNB* fue normalizada respecto al gen *HPRT*. Los datos se representan en escala logarítmica (log10) como número de veces sobre el nivel de expresión en células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Barras con entramado cuadrícula: células no infectadas; barras punteadas: células no infectadas tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (*), (**) y (***) indican un $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

incremento progresivo en la activación de PKR, empezando entre las 12 y 15 h p.i., siendo mayor a 24 h p.i. Aunque existe una cierta fosforilación de PKR en las células M+3, ésta es claramente mucho menor que en las células I+3, a pesar de que la cantidad total de PKR (t-PKR) es visiblemente mayor en estas células.

Al analizar la expresión de VP3 (Fig. 17A), se observa también un incremento gradual de la acumulación de la proteína viral desde las 12 h hasta las 24 h p.i. en las células infectadas sin tratamiento con IFN. Sin embargo, como se ha indicado previamente en la Figura 7C, las células infectadas y tratadas con IFN presentan una reducción de VP3 en todos los tiempos analizados (Fig. 17A).

Por otra parte, analizamos la expresión del gen de *IFNB* en las muestras I+3 a los distintos tiempos por qRT-PCR. Para este análisis, células HeLa infectadas, tratadas o sin tratar con IFN a 3 h p.i. fueron recogidas a 4, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 h p.i. La Figura 17C muestra una progresiva inducción de *IFNB* desde las 9 h p.i. hasta el último punto de análisis (24 h p.i.), donde la expresión de este gen es 42 veces mayor que al inicio de la infección. Se puede intuir un ligero aumento en la expresión de *IFNB* entre 4 y 9 h p.i., pero estos valores no son significativamente más altos que los obtenidos en muestras simplemente infectadas (I), o en las no infectadas tratadas con IFN (M+3), recogidas a 24 h p.i. Por otro lado, cuando se analiza la

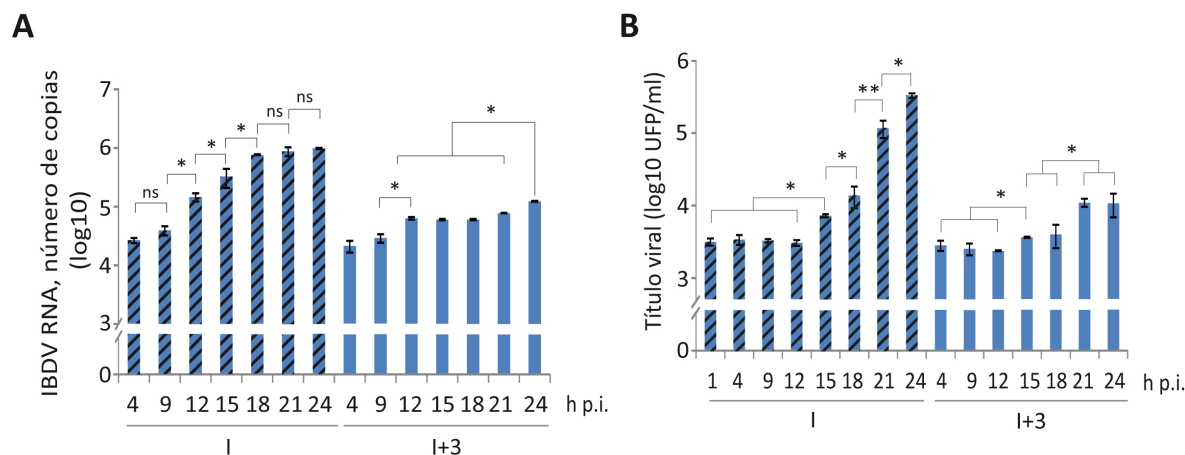


Figura 18. La replicación del RNA viral y la producción de virus extracelular se reducen en presencia de IFN- α . Células HeLa infectadas (I) con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con 1.000 UI/ml de hIFN- α a 3 h p.i. (I+3) y recogidas a los tiempos que se indican. **A.** Los extractos celulares fueron sometidos a extracción de RNA total para el análisis de la replicación viral por qRT-PCR, empleando cebadores que hibridan en el segmento genómico A, en la zona que codifica la proteína VP3. **B.** Titulación del virus extracelular en los sobrenadantes. Los datos se representan en escala logarítmica (log10). Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

replicación viral a estos mismos tiempos, no existen variaciones significativas en la cantidad de RNA viral entre las 4 y 9 h p.i. en células infectadas, tratadas o sin tratar con la citoquina (Fig. 18A). A partir de ese momento, y hasta las 18 h p.i., en las muestras I se observa un incremento gradual en los niveles de RNA viral, que llega a ser de aproximadamente 2 unidades logarítmicas a 18 h p.i., y posteriormente los niveles de RNA viral se mantienen en valores similares hasta las 24 h p.i. Sin embargo, en las muestras I+3 se detecta un ligero incremento, aunque significativo, de menos de 1 log entre las 4 y 12 h p.i. Estos valores son máximos a 24 h p.i., pero se mantiene en niveles muy inferiores (8 veces menores) a los obtenidos en células infectadas sin tratamiento con IFN.

En concordancia con los datos obtenidos de expresión de VP3 y de producción de RNA viral, la Figura 18B muestra que el tratamiento con IFN afecta de manera considerable al título viral. En las muestras I se puede observar un incremento progresivo del título viral desde las 12 hasta las 24 h p.i., alcanzando un máximo de $3,3 \times 10^5$ UFP/ml. Sin embargo, la producción de virus extracelular se reduce significativamente en presencia de IFN, llegando a alcanzar un título máximo de $1,1 \times 10^4$ UFP/ml, que es 30 veces menor que el título alcanzado en los cultivos no tratados.

En conjunto, estos resultados muestran que en las células I+3 la fosforilación de PKR, la expresión del gen de *IFNB* y la activación de las caspasas ocurre alrededor de las 12 y 15 h p.i. Aunque la replicación del RNA viral se reduce significativamente en presencia de IFN, cabe

la posibilidad de que la pequeña cantidad de dsRNA producida pueda ser el desencadenante de estos efectos, incluida la inducción de la apoptosis.

1.11. PRODUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS HeLa TRANSFECTADAS CON EL RNA GENÓMICO DE IBDV TRAS TRATAMIENTO CON IFN

Para investigar el mecanismo por el que se produce la apoptosis en las células infectadas y tratadas con IFN, se intentó determinar qué factor viral estaba involucrado en el desarrollo de este proceso. Con este objetivo, se obtuvieron y purificaron partículas subvirales desprovistas del RNA genómico, o VLPs, y por otra parte, se purificó el RNA viral a partir de viriones purificados. Ambos componentes se utilizaron para tratar células HeLa, a las que posteriormente se añadió IFN- α (1.000 UI/ml), para comprobar su capacidad de activar la ruta apoptótica. La Figura 19 muestra los resultados de la purificación mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa de las VLPs, así como de viriones de IBDV. El panel A muestra los resultados del análisis por *Western Blot* de las fracciones obtenidas a partir de ambas preparaciones. Se recogieron las fracciones de cada preparación que presentaban una mayor cantidad de VP2, que son las fracciones 6-9 y 5-8 para las partículas de IBDV y VLPs, respectivamente. Tras reunir las fracciones seleccionadas de cada preparación, estas se sometieron a tinción negativa y se analizaron por microscopia electrónica. Las figuras 19B y 19C muestran la integridad de ambos tipos de

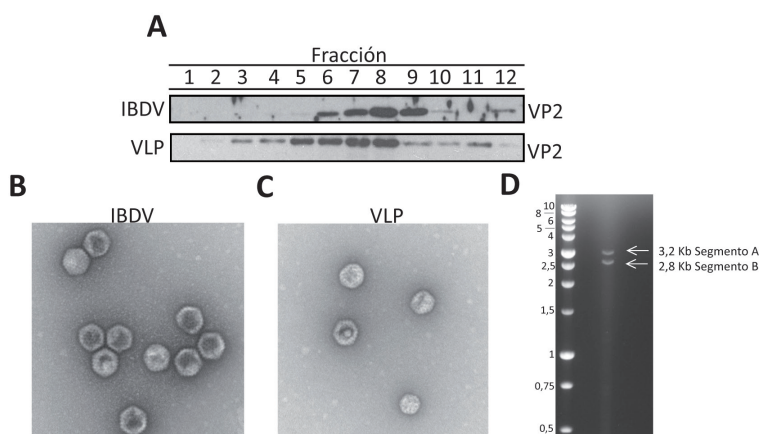


Figura 19. Análisis de la purificación de partículas de IBDV, VLPs y del dsRNA de IBDV. **A.** Las partículas de IBDV y las VLPs fueron purificadas a través de un gradiente de sacarosa tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Se recogieron 12 fracciones a partir del gradiente, las cuales fueron analizadas por *Western Blot* con un anticuerpo contra la proteína de la cápsida viral, VP2. **B.** Las fracciones con mayor concentración de la proteína viral se reunieron y las preparaciones de viriones y de VLPs resultantes se analizaron por tinción negativa y microscopía electrónica para evaluar la integridad de dichas partículas. **C.** Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa de la integridad del RNA genómico de IBDV. Se indica el tamaño de ambos segmentos (flechas blancas). Kb: kilobase.

partículas. Por otra parte, la calidad del RNA viral purificado fue analizada por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 19D). Se puede observar la integridad de los dos fragmentos que constituyen el genoma de IBDV.

Una vez obtenidos ambos componentes, se llevó a cabo el experimento en el que se utilizaron las VLPs de IBDV para tratar células HeLa. Por otro lado, las células fueron sometidas a transfección con el RNA genómico purificado. Después de 3 h de incubación con las VLPs o el RNA viral, estas células se trataron con IFN (R+3 o V+3, respectivamente). Todas las muestras se recogieron a las 24 h. Como control, se utilizaron células HeLa infectadas con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula y tratadas con IFN a las 3 h p.i.

En la Figura 20 se muestra como en las células

transfectadas con el RNA genómico viral se produce un incremento en la activación de las caspasas 3 y 7 (Fig. 20). Sin embargo, esta activación es significativamente mayor en las células tratadas con IFN, alcanzando valores similares a los obtenidos en células infectadas con IBDV y tratadas con IFN. Por el contrario, la incubación con VLPs no desencadena una respuesta apoptótica, en presencia o ausencia de IFN, dada la ausencia de la actividad de las caspasas. Todo esto indica que la unión de IBDV, representada en este experimento por las VLPs, a través del receptor viral presente en la membrana plasmática, y su entrada al interior de la célula no son los responsables del proceso apoptótico. Sin embargo, estos resultados sugieren que el RNA genómico podría ser el componente viral que contribuye a este efecto. Como ya se mencionó en el apartado

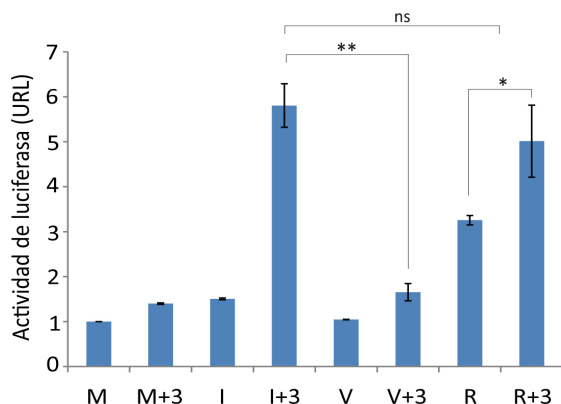


Figura 20. La transfección con dsRNA genómico de IBDV, pero no la incubación con con VLPs, induce apoptosis tras el tratamiento con IFN- α . Células HeLa no infectadas (M), infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula), tratadas con VLPs (4,9 μ g)(V) o transfectadas con 100 ng de RNA genómico de IBDV (R) fueron tratadas con 1.000 UI/ml de IFN (M+3, I+3, V+3 y R+3, respectivamente). Las células fueron recogidas a las 24 h p.i. Determinación de la apoptosis mediante el reactivo Caspase-Glo 3/7. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

de Materiales y métodos, la cantidad de RNA genómico transfectado equivale a la cantidad de RNA aportada en una infección habitual con una MOI de 2. Esto lleva a pensar que o bien el RNA aportado por las partículas del inóculo, o bien la pequeña cantidad de RNA producido durante la infección (Fig. 18A), podrían ser los desencadenantes de la apoptosis observada en las células HeLa.

1.12. IBDV PRODUCE APOPTOSIS A TIEMPOS MUY TARDÍOS

Para extender el análisis de la apoptosis por un periodo p.i. más largo, se realizó una

cuantificación a tiempo real de la muerte celular empleando el instrumento *IncuCyte® Zoom System*. Para ello, se infectaron células HeLa con IBDV a una MOI de 2 UFP/ml. Después de la hora de adsorción se añadió el agente *IncuCyte® Caspase-3/7 Apoptosis Assay Reagent*, y a las 3 h p.i. se trataron las células con IFN. La muerte celular por apoptosis fue analizada en las muestras M, M+3, I e I+3 hasta las 45 h p.i. De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, la Figura 21A indica un aumento de la muerte celular desde las 12 h p.i. hasta las 32 h p.i. en las muestras I+3. Por el contrario, en las muestras I, la muerte celular es casi inexistente hasta las 24 h p.i., pero a partir de este momento se observa un aumento gradual del número de células apoptóticas. Este resultado muestra claramente que el tratamiento con IFN acelera el proceso apoptótico en las células infectadas con IBDV. Para caracterizar esta apoptosis tardía, se infectaron células HeLa con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula, se recogieron a 24, 32, 40 y 48 h p.i. y se sometieron a diferentes análisis.

Los resultados de *Western Blot* (Fig. 21B) señalan que se produce fosforilación de PKR a tiempos tardíos en las muestras infectadas en ausencia de IFN. Se puede observar una clara fosforilación a partir de 32 h p.i., que no se observa en las células no infectadas. Por otra parte, la Figura 21C muestra el incremento progresivo de la expresión del gen *IFNB* desde 32 h p.i. en las muestras I, alcanzando valores incluso superiores a los obtenidos en las muestras I+3 recogidas a 24 h p.i. Cuando se analiza la

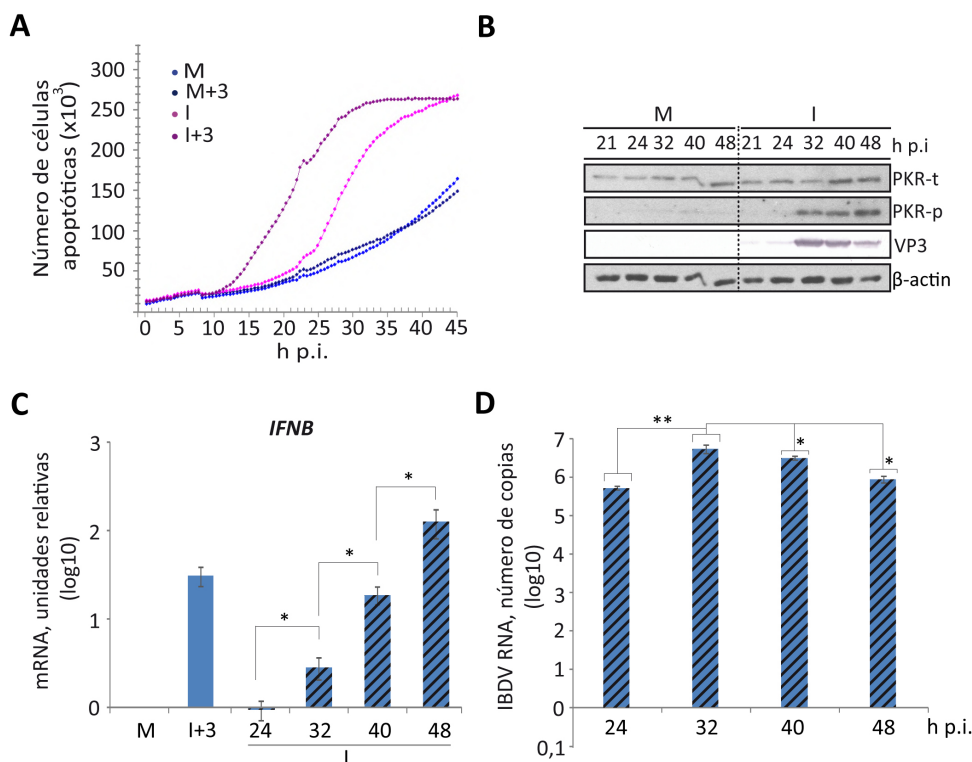


Figura 21. IBDV induce apoptosis a tiempos tardíos en células HeLa. Células HeLa no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 UI/ml de IFN a 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a los tiempos indicados. **A.** Cuantificación de las células apoptóticas a tiempo real. Las células fueron incubadas durante todo el experimento con el reactivo *IncuCyte® Caspase-3/7 Apoptosis Assay Reagent*, y monitorizadas con el aparato *IncuCyte® Zoom System* durante 45 h. La medida de la apoptosis se llevó a cabo mediante el *IncuCyte® ZOOM Software* a partir de dos réplicas para cada condición. **B.** Análisis por *Western Blot* empleando los siguientes anticuerpos: -PKR total (PKR-t), -PKR fosforilada (Thr 446) (PKR-p) y -VP3. La proteína β-actina se utilizó como control de carga. **C y D.** Análisis por qRT-PCR de la expresión del gen de *IFNB* (**C**) y del RNA viral (**D**) empleando cebadores que hibridan en el segmento genómico A, en la zona que codifica la proteína VP3. La expresión del gen *IFNB* fue normalizada respecto al gen *HPRT* y los valores fueron representados como número de veces sobre el nivel de expresión en las células no infectadas (Mock). Los datos se representan en escala logarítmica (log10) como número de veces sobre el nivel de expresión en células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

replicación del RNA viral (Fig. 21D), se observa un aumento de 1 unidad logarítmica entre 24 y 32 h p.i., lo que coincide con el aumento de la acumulación de la proteína viral VP3 (Fig. 21B), siendo este aumento de 15 veces respecto al tiempo de 24 h p.i. En la imagen se muestra una menor exposición que en las figuras anteriores para distinguir adecuadamente la acumulación

de la proteína viral correspondiente a cada tiempo. A partir de las 32 h p.i., la carga de RNA viral empieza a disminuir, siguiendo un patrón inverso al observado en el análisis de apoptosis, la fosforilación de PKR y la expresión de *IFNB*, llegando a ser 7 veces menor a 48 h p.i. respecto a los niveles alcanzados a 32 h p.i.

1.13. LOS TRATAMIENTOS CON IFN- β E IFN- γ EN CÉLULAS INFECTADAS CON IBDV PRODUCEN APOPTOSIS DE LA MISMA MANERA QUE EL TRATAMIENTO CON IFN- α

Para determinar si la apoptosis desencadenada en células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN era dependiente del IFN empleado, se

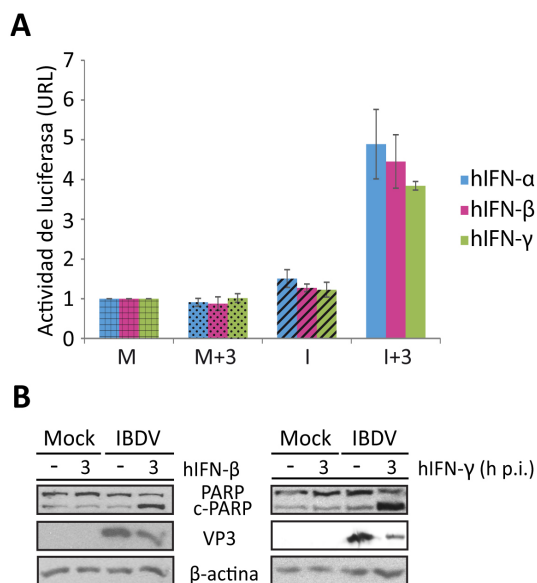


Figura 22. Los tratamientos con IFN- β e IFN- γ en células infectadas con IBDV inducen apoptosis. Células HeLa no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con 1.000 UI/ml de hIFN- α , hIFN- β o hIFN- γ a las 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a las 24 h p.i. **A.** Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. **B.** Análisis por *Western Blot* empleando los siguientes anticuerpos: -PARP y -VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. PARP-c (proteína PARP procesada). Barras con entramado cuadrícula: células no infectadas (Mock); barras punteadas: células no infectadas tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN.

decidió llevar a cabo los mismos experimentos empleando IFN- β e IFN- γ . Para ello, infectamos células HeLa con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula y se trataron con 1.000 UI/ml de IFN- α , - β y - γ . Las células fueron recogidas a las 24 h p.i. y se analizó la actividad de las caspasas 3 y 7, y el patrón de corte de PARP. Como indica la Figura 22A, la apoptosis desencadenada en las muestras I+3 es parecida en todos los casos cuando se emplea cualquiera de los tres IFNs. Del mismo modo, al analizar el corte de PARP en las muestras I+3 (Fig. 22B y C), se observa un gran procesamiento de esta proteína tanto bajo el tratamiento con IFN- β como con IFN- γ . Estos resultados indican que tanto los IFNs de tipo I como el IFN de tipo II desencadenan una respuesta apoptótica en células HeLa previamente infectadas con IBDV.

1.14. LAS RUTAS EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA PARTICIPAN EN DIFERENTE MEDIDA EN LA PRODUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS POR IBDV BAJO EL TRATAMIENTO CON IFN

Para caracterizar la apoptosis producida en las células infectadas y tratadas con IFN, se analizó la contribución de las rutas extrínseca e intrínseca mediante la medida de la actividad de las caspasas 8 y 9, respectivamente. Como hemos demostrado en esta tesis, la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 ocurre entre las 12 y 15 h p.i. en las muestras I+3, por lo que cabría esperar detectar la actividad de las caspasas iniciadoras 8 y/o 9 a tiempos anteriores. De esta forma, se recogieron

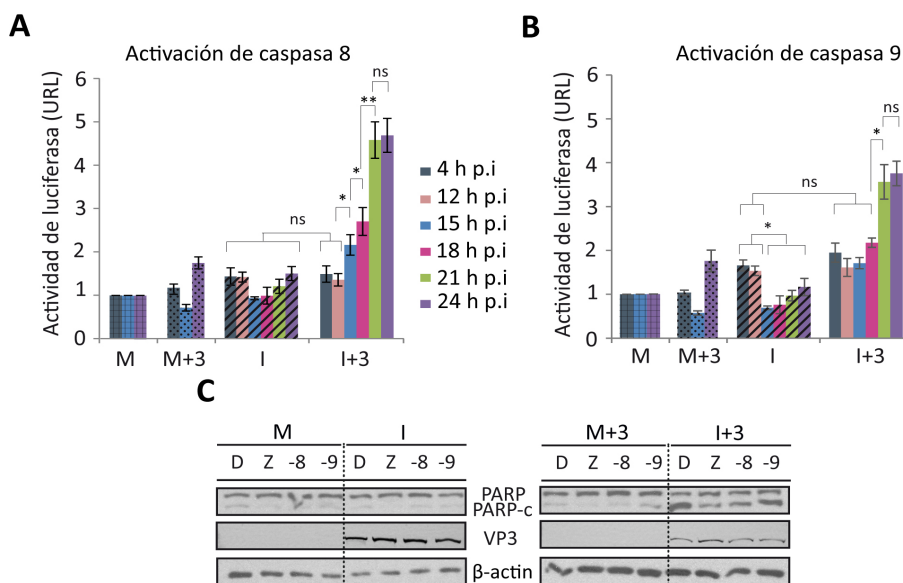


Figura 23. Participación de las rutas extrínseca e intrínseca en la producción de apoptosis en células HeLa infectadas por IBDV bajo tratamiento con IFN- α . Células HeLa no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 UI/ml de IFN a 3 h p.i. (M+3 e I+3). Las células fueron recogidas a los tiempos indicados y sometidas a diferentes análisis. **A y B.** Determinación de la activación de las rutas extrínseca e intrínseca mediante los reactivos *Caspase-Glo 8* y *9*, respectivamente. La actividad de las caspasas 8 y 9 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. **C.** Análisis por *Western Blot* de extractos celulares provenientes de células HeLa tratadas tras la hora de adsorción viral con los distintos inhibidores a una concentración de 50 μ M tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Se usó DMSO como control del tratamiento. Se emplearon anticuerpos frente a la proteína de PARP, VP3 y β -actina (usada como control de carga). PARP-c (proteína PARP procesada). Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. Inhibidor general de las caspasas (z), de la caspasa 8 (-8) y de la caspasa 9 (-9). DMSO (D). ns: no significativo.

muestras M, M+3, I e I+3 a 4, 12, 15, 18, 21 y 24 h p.i. y se analizaron empleando los kits *Caspase-Glo 8 assay* y *Caspase-Glo 9 assay kits*. La Figura 23A muestra que la activación de la caspasa 8 ocurre a partir de las 12 h p.i., observándose un incremento progresivo hasta las 24 h p.i. en las muestras I+3. Sin embargo, la actividad de la caspasa 9 (Fig. 23B) no se detecta hasta las 21 h p.i., y se mantiene similar hasta las 24 h p.i. De forma adicional, tratamos las células con inhibidores de las caspasas 8 y 9, así como con un inhibidor general de

caspasas (Z) o con DMSO como controles. El análisis de la degradación de PARP (Fig. 23C) mediante *western blot*, y su cuantificación mediante el densitometrado de las bandas correspondientes a la proteína intacta y a la forma procesada, indica que se produce una reducción en el corte de esta proteína del 80% y 20% cuando se emplean los inhibidores de las caspasas 8 y 9, respectivamente. Esta mayor reducción cuando se emplea el inhibidor de la caspasa 8 indica que la ruta extrínseca podría controlar de alguna manera la activación de la

ruta intrínseca en las células HeLa infectadas y tratadas con IFN.

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LÍNEAS CELULARES DE POLLO

Las células HeLa, utilizadas hasta el momento como modelo de estudio, nos han permitido establecer una relación directa entre el IFN y la apoptosis desencadenada en las células infectadas por IBDV. Como se ha indicado previamente, IBDV causa grandes pérdidas en el sector avícola, ya que genera un estado de inmunodepresión en los pollos, que puede causarles la muerte, o en aquellos que sobreviven, hacerles más susceptibles a otras enfermedades. Por tal motivo, es importante comprobar si el IFN produce en las células de pollo infectadas con IBDV los mismos efectos que los observados en las células HeLa. Para ello se emplearon en esta tesis doctoral dos líneas de células de pollo: células DF-1 y DT40. Las células DF-1 han sido empleadas durante mucho tiempo como modelo celular para el estudio de la patogenia causada por IBDV. Por otro lado, las células DT40, linfocitos B adaptados a crecer en cultivo, podrían considerarse como el modelo de infección *in vitro* de una línea celular más próximo a la situación *in vivo*.

2.1. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE chIFN- α

2.1.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE chIFN- α

Debido a una escasa oferta comercial de IFN- α de pollo (chIFN- α) se decidió producir y purificar chIFN- α en el laboratorio. De este

modo, generamos un virus recombinante basado en el virus VV que expresa, de forma inducible por IPTG, el chIFN- α fusionado a una cola de histidinas en su extremo N-terminal (rVV-chIFN- α), siguiendo para ello la metodología descrita en el apartado de Materiales y métodos. En primer lugar, con el fin de determinar las mejores condiciones de producción de chIFN- α para obtener el mayor rendimiento, manteniendo su funcionalidad biológica, se realizó un primer ensayo en el que infectamos células HeLa con el virus rVV-chIFN- α a una MOI de 5 UFP/célula, para recoger tanto los sobrenadantes como las células a diferentes tiempos, 8, 16 y 24 h p.i., para determinar el momento de máxima producción de chIFN- α . Los extractos celulares fueron analizados mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-histidinas. Se observó la expresión de la proteína a 16 y 24 h p.i., habiendo una mayor acumulación de proteína a 24 h p.i. (Fig. 24A). Por otra parte, los sobrenadantes recogidos a 24 h p.i. fueron analizados para determinar la actividad biológica del chIFN- α producido. Para ello, se trataron cultivos de células DF1 con diluciones 1:4 de los mismos. 16 h después del tratamiento las células se infectaron con un virus recombinante basado en el virus de la enfermedad de Newcastle que expresa la proteína GFP (NDV-GFP), a una MOI de 1 UFP/célula durante 24 h p.i. Como se muestra en la Figura 24B, pudimos comprobar el efecto protector del chIFN- α secretado al sobrenadante frente a la infección por NDV-GFP. Se observó protección, prácticamente completa, hasta la dilución 1:1024, a diferencia de lo que ocurre

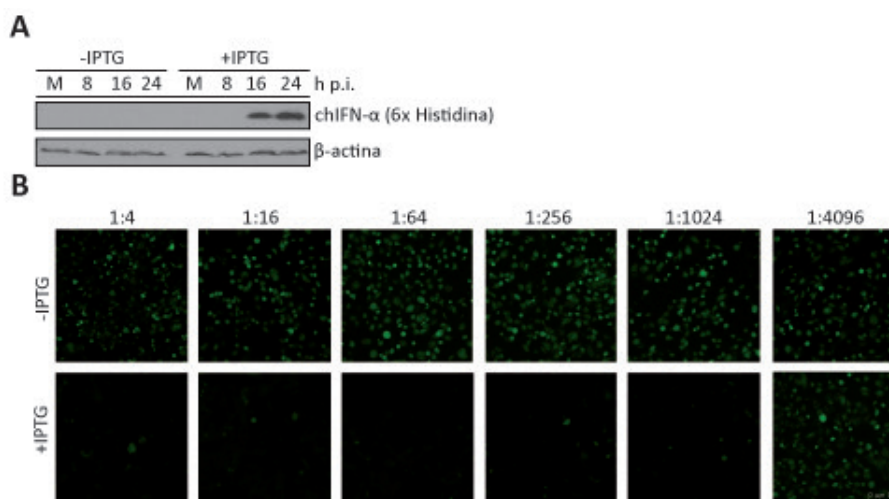


Figura 24. Análisis de la expresión de chIFN- α en células HeLa infectadas con rVV-chIFN- α . Células HeLa no infectadas (M) o infectadas (I) con el virus rVV-chIFN- α a una MOI de 5 UFP/célula fueron incubadas en presencia o ausencia de 1 mM IPTG. Las células se recogieron a los tiempos indicados. **A.** Análisis de los extractos celulares mediante *Western Blot* con el anticuerpo contra la cola de histidinas que presenta la proteína chIFN- α . La proteína β -actina se utilizó como control de carga. **B.** Los sobrenadantes recogidos a las 24 h p.i. fueron empleados para determinar la funcionalidad biológica del chIFN- α producido. Para ello, células DF-1 fueron pretratadas durante 16 h con las diluciones indicadas de los sobrenadantes, y posteriormente infectadas con el virus NDV-GFP a una MOI de 1 UFP/células. Las imágenes se tomaron a las 24 p.i.h con un microscopio de epifluorescencia.

en los cultivos tratados con los sobrenadantes que se emplearon como control, que provienen de células infectadas con rVV-chIFN- α en las que no se indujo la expresión de chIFN- α . Estos resultados indican que el chIFN- α producido es capaz de ejercer su función biológica y protectora frente a la infección viral.

2.1.2. PURIFICACIÓN DE chIFN- α

Una vez se concretó el tiempo de infección para obtener mayor expresión de chIFN- α , y sabiendo que el chIFN mantenía su funcionalidad biológica, se procedió a producirlo a mayor escala y a purificarlo. De esta forma, se infectó un mayor número de células HeLa a una MOI de 5 UFP/célula con el virus rVV-chIFN- α en presencia de IPTG. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 h p.i. y se sometieron a

purificación por cromatografía de afinidad en resina de cobalto, tal como se describe en el correspondiente apartado de Materiales y métodos. Se recogieron dos eluidos para rescatar la máxima cantidad de proteína, y ambos fueron sometidos a diálisis para eliminar los restos de imidazol. Tanto las muestras obtenidas tras la elución, como las muestras recogidas durante el proceso de purificación, fueron analizadas por *Western Blot*. Como se muestra en la Figura 25A, respecto del total de proteína presente en el lisado celular (carril 1), la mayoría quedó unida a la resina (carril 5), y durante el proceso de purificación se rescató gran parte de la misma en la primera elución (carril 6), una pequeña cantidad en la segunda elución (carril 7), quedando una mínima cantidad unida a la resina al final del

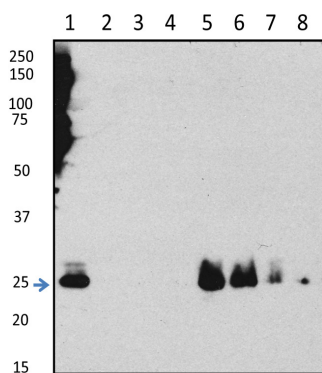


Figura 25. Purificación de la proteína chIFN- α . Análisis por Western Blot de los diferentes pasos de purificación de la proteína chIFN- α . Para el análisis se empleó un anticuerpo contra la cola de histidinas que presenta la proteína chIFN- α . Carril 1: lisado celular. Carril 2: sobrenadante antes de la incubación con la resina. Carril 3: sobrenadante después de la incubación con la resina. Carril 4: tampón de lavado de la resina. Carril 5: proteína unida a resina, antes de elución. Carril 6: primer eluido. Carril 7: segundo eluido. Carril 8: resina tras la elución de la proteína. La flecha indica la posición de la proteína. A la izquierda de la figura se muestra la posición y el tamaño de los marcadores de peso molecular en kDa.

proceso (carril 8). No se detectó proteína en los carriles correspondientes al sobrenadante inicial (carril 1), posiblemente porque en estas condiciones el chIFN se encontraba muy diluido, al sobrenadante después de la incubación con la resina (carril 3), ni en los lavados de la resina (carril 4). Además, el análisis de las muestras mediante electroforesis en los geles de poliacrilamida sometidos a tinción con plata, indica un alto grado de pureza del chIFN- α (datos no mostrados).

2.1.3. TITULACIÓN DE chIFN- α

Para determinar el título del chIFN- α producido se llevó a cabo el ensayo biológico descrito en el apartado anterior, utilizando para ello diluciones 1:4 de las preparaciones de chIFN- α correspondientes al primer y segundo eluido.

Para el cálculo del título se decidió emplear el método de Reed-Müench, basado en el cálculo de la distancia proporcional entre dos diluciones, una por encima del 50% de protección y la otra por debajo. De esta forma el título del primer eluido fue de $1,4 \times 10^6$ U/ml y del segundo $4,1 \times 10^4$ U/ml. Además, se analizó la actividad biológica de ambos eluidos en comparación con la del IFN- α humano comercial. Para ello, células HeLa y DF-1 fueron tratadas con diluciones seriadas 1:10 o 1:4 del hIFN- α o chIFN- α , respectivamente, durante 16 h. Posteriormente, las células fueron infectadas con el virus NDV-GFP, y a las 24 h p.i. fueron recogidas para medir la fluorescencia de la proteína GFP como indicadora del efecto de la infección. Como se puede observar en la Figura 26, el porcentaje de infección en las células DF-1 se reduce significativamente, hasta un 97 o 95% cuando se tratan las células con 4.000 o 1.000 U/ml de chIFN- α del primer eluido, respectivamente. Con el segundo eluido de chIFN- α se consigue una protección parecida con 4.000 U/ml, siendo ésta del 93%. Esto demuestra la actividad antiviral del chIFN producido. Además, se alcanzan porcentajes de protección celular muy cercanos a los conseguidos cuando se tratan células HeLa con el hIFN- α comercial.

2.2. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR IBDV EN CÉLULAS DF-1 BAJO EL TRATAMIENTO CON chIFN- α

2.2.1. IBDV ES SENSIBLE A LA ACCIÓN ANTIVIRAL DEL chIFN- α EN CÉLULAS DF-1

Nuevamente se quiso corroborar que IBDV era

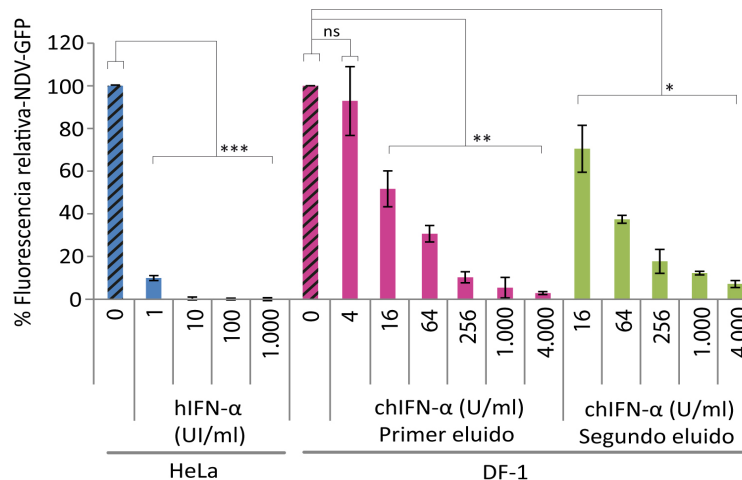


Figura 26. Ensayo de funcionalidad de la proteína chIFN- α . Células HeLa y células DF-1 fueron tratadas durante 16 h con cantidades crecientes de hIFN- α (en UI/ml) o de chIFN- α (del primer o segundo eluido, en U/ml), respectivamente. Las células fueron infectadas a continuación con el virus NDV-GFP a una MOI de 1 UFP/célula durante 24 h. Posteriormente se midió la señal de fluorescencia y se relativizaron los valores de cada línea celular respecto a los valores obtenidos en las mismas células no tratadas con IFN (barras con patrón de rayas). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas correspondientes a dos experimentos independientes. Los asteriscos (*), (**) y (***) indican un $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

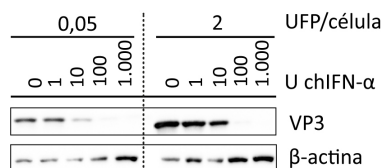


Figura 27. IBDV es sensible a la acción antiviral de chIFN- α en células DF-1. Células DF-1 fueron pretratadas con diferentes dosis de chIFN- α (1, 10, 100 y 1.000 U/ml) durante 16 horas, y posteriormente fueron infectadas con dos MOI de IBDV, 0,05 y de UFP/célula. Las células se recogieron a las 24 h p.i. y los extractos celulares se analizaron mediante *Western Blot* empleando un anticuerpo frente a la proteína VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga.

sensible al efecto del IFN- α en células de pollo. Para ello, se trataron células DF-1 con 1, 10, 100 y 1.000 U/ml de chIFN- α durante 16 h.

Posteriormente, las células fueron infectadas con IBDV a una MOI de 0,05 o 2 UFP/célula y recogidas a 24 h p.i. Las muestras fueron sometidas a *Western Blot* para analizar el patrón de expresión de la proteína viral VP3.

Los resultados mostrados en la Figura 27 señalan una clara reducción en la expresión de VP3 cuando las células son pretratadas con 10 o 100 U/ml de chIFN- α e infectadas a una MOI de 0,05 o 2 UFP/célula, respectivamente. Esto demuestra que al igual que ocurre en las células humanas HeLa, IBDV es incapaz de replicar en células de pollo que han activado su respuesta antiviral debido al tratamiento con IFN.

2.2.2. EL TRATAMIENTO CON $\text{chIFN-}\alpha$ EN CÉLULAS DF-1 INFECTADAS CON IBDV CAUSA APOPTOSIS

A continuación, se quiso averiguar si el tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$ tras la infección con IBDV desencadenaba la producción de apoptosis, al igual que ocurre en las células HeLa. Para ello, infectamos células DF-1 con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula y las tratamos a las 3 h p.i. con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\alpha$. Las muestras M, M+3, I e I+3 fueron recogidas a las 16 h p.i. para analizar la activación de las caspasas 3 y 7. Como se muestra en la Figura 28A, se produce una inducción significativa de la apoptosis en las muestras I+3. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en las células HeLa, IBDV es capaz de inducir apoptosis a 16 h p.i., aunque los niveles de actividad de las caspasas son claramente inferiores a los observados en las células infectadas y tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$ (I+3).

Por otro lado, se analizó el estado de los rRNA 28S y 18S bajo las condiciones ensayadas para determinar la posible implicación de la proteína RNasaL en la apoptosis. Como se muestra en la Figura 28B, los rRNA permanecen íntegros, por lo que, al igual que en las células HeLa, parece ser que la enzima RNasaL no participa en la producción de apoptosis en las células DF-1 en estas condiciones experimentales.

2.2.3. PKR DESEMPEÑA UN PAPEL IMPORTANTE EN LA RUTA DE LA APOPTOSIS INDUCIDA EN CÉLULAS DF-1 INFECTADAS CON IBDV Y TRATADAS CON $\text{chIFN-}\alpha$.

2.2.3.1. La inhibición de la actividad de PKR produjo una reducción significativa en la apoptosis desencadenada en las células DF1.

Como hemos indicado en esta tesis doctoral, PKR es una proteína que juega un papel crucial en el desencadenamiento de la apoptosis en células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN. Por tal motivo se investigó el papel de PKR en la inducción de apoptosis en células DF-1 tratadas bajo las mismas condiciones. Para ello, infectamos células DF-1 con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula, y tras la hora de adsorción las células fueron tratadas con un inhibidor específico de PKR (C16) a una concentración de 0,5 μM . Esta molécula ha sido descrita como un potente inhibidor de PKR, bloqueando su autofosforilación (131, 132). A continuación, las células fueron tratadas con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\alpha$ a las 3 h p.i. Las muestras M, M+3, I e I+3 fueron recogidas a las 16 h p.i. y analizadas empleando el kit *Caspase-Glo 3/7 assay kit*. En la Figura 28C se puede observar una reducción significativa de la actividad de las caspasas en las muestras I+3 en presencia del inhibidor. Esto indica que PKR juega también un papel importante en la producción de apoptosis en esta línea celular bajo las condiciones ensayadas. La Figura 28D muestra los títulos virales en los sobrenadantes de las células infectadas tratadas o no con $\text{chIFN-}\alpha$, y en presencia o ausencia del inhibidor, donde se observa que el inhibidor no afecta a la producción de la progenie viral en ningún caso. Sin embargo, se puede observar el efecto del tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$ sobre el título viral, el cual sufre una reducción aproximada de 3 veces

con respecto a células sin tratamiento.

2.2.3.2. Generación de células DF-1 carentes de la expresión de PKR por la tecnología CRISPR-Cas9

Dado que el tratamiento con el inhibidor de PKR produjo una reducción significativa en la actividad de las caspasas, se decidió

generar unas células DF-1 que no expresasen el gen PKR (DF-1-PKR). Para ello se empleó la tecnología CRISPR/Cas9, a través de 2 guías (G_1 - G_2) que produjeran un doble corte en el gen diana. Estas guías fueron diseñadas de tal manera que el doble corte condujese a una delección que incluyese la pérdida del dominio de unión a dsRNA, y parte del sitio activo y

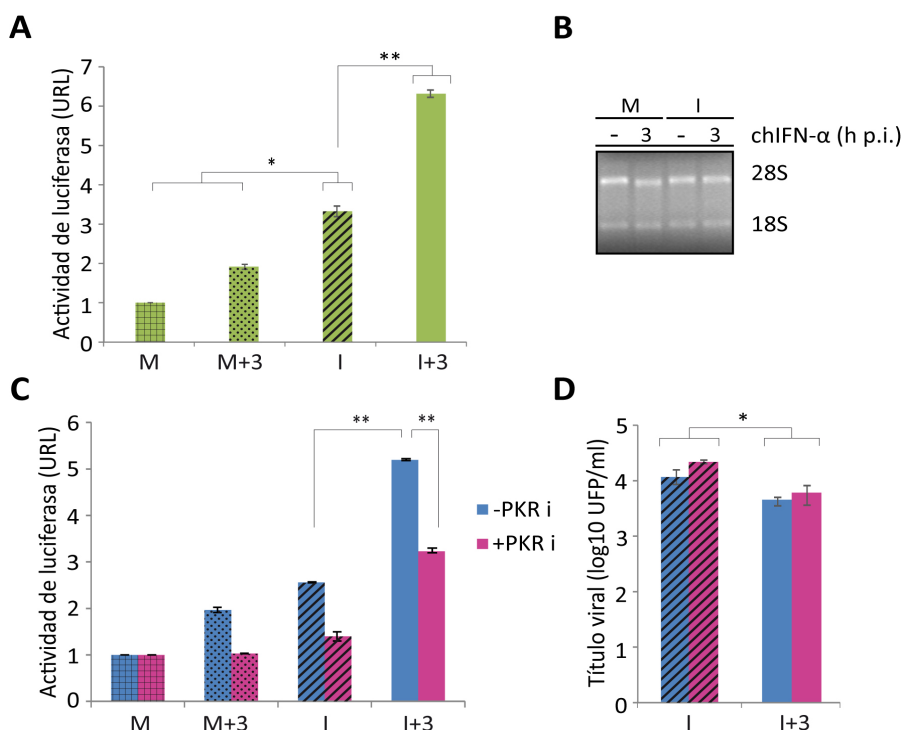


Figura 28. Apoptosis en células de pollo DF-1 infectadas con IBDV y tratadas con chIFN-α. Células DF-1 no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 U/ml de chIFN-α a 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a 16 h p.i. **A y C.** Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. En el caso del panel C, las células DF-1 fueron tratadas tras la hora de adsorción viral con un inhibidor de la proteína PKR, C16 (0,5 μ M)(+PKR i), y como control se emplearon células tratadas con DMSO (-PKR i). **B.** Análisis por electroforesis en geles de agarosa del RNA ribosómico (rRNA). A la derecha de la figura se indica el tamaño de los rRNA (28S y 18S). **D.** Titulación del virus extracelular en los sobrenadantes de células DF-1 infectadas y tratadas con chIFN-α en presencia o ausencia del inhibidor C16. Los datos se representan en escala logarítmica (log10). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Barras con entramado cuadrícula: células no infectadas (Mock); barras punteadas: células no infectadas tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

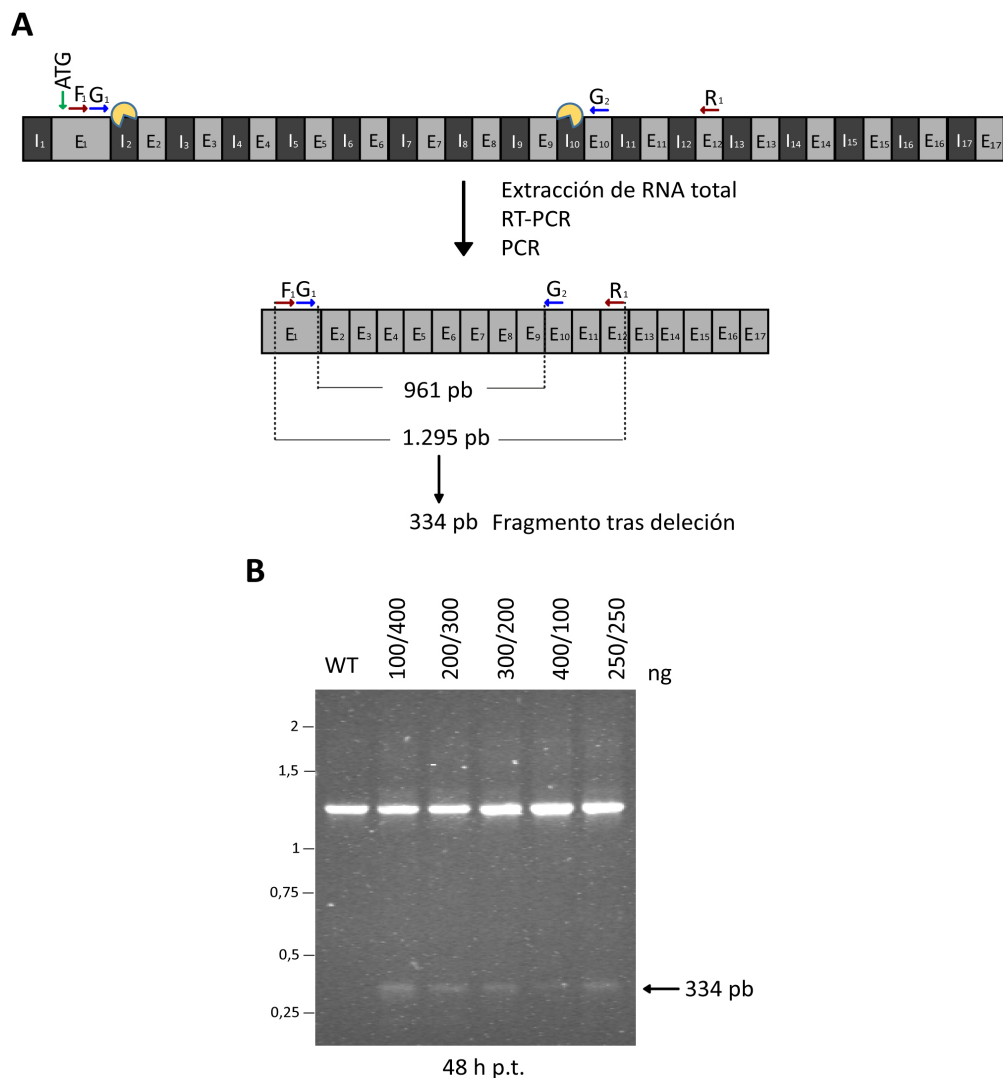


Figura 29. Optimización de las condiciones de transfección para la generación de células DF-1-PKR por la tecnología CRISPR/Cas9. Células DF-1 fueron sembradas en placas de 24 pocillos y transfectadas con distintas cantidades de los plásmidos que portan las secuencias de las guías (G1-G2) según se indica en la figura, junto con 1.000 ng de phCas9 y 100 ng pEGFP-C1. A las 48 h p.t., se recogió el pool de células, se aisló el RNA, se obtuvo un cDNA y se llevó a cabo PCR. **A.** Esquema del gen PKR de pollo donde se representan los intrones (cajas negras) y lo exones (cajas grises). Las flechas azules indican la zona de reconocimiento de las guías de RNA y la zona aproximada de corte en el genoma por la enzima Cas9 (amarillo). En el esquema inferior se indican los fragmentos resultantes de la amplificación del cDNA con los cebadores F_1 - R_1 (flechas rojas). A partir de la secuencia parental se obtendría un fragmento de 1.295 pb. El corte por la enzima Cas9 eliminaría un fragmento aproximado de 961 pb, por lo que el fragmento amplificado tras la delección tendría un tamaño aproximado de 334 pb. **B.** Los productos de las PCR de los cDNA se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. A la derecha de cada gel se indica el marcador de peso molecular (kb). WT (células DF-1 no transfectadas).

de autofosforilación de la proteína (Fig. 5).
Las guías fueron clonadas en el plásmido

MLM3636 y se comprobó que su secuencia
era correcta. Para la optimización del sistema,

células DF-1 sembradas en placas de 24 pocillos fueron transfectadas con distintas cantidades de los plásmidos que codifican las guías, y una cantidad constante del plásmido pCas9, y del plásmido pEGFP-C1 utilizado como control de transfección. Se recogieron las diferentes muestras a las 48 h post-transfección, y se extrajo el RNA total para llevar a cabo un análisis por RT-PCR para determinar la cantidad óptima de las guías para conseguir la delección. En la Figura 29A se muestra un esquema indicando, a partir del cDNA, el tamaño aproximado del fragmento que cortaría la enzima Cas9 (961 pb), el tamaño del amplicón obtenido a partir del gen parental empleando los cebadores F_1 - R_1 (1.295 pb) que hibridan en la zona externa de la delección, y el tamaño del fragmento que resultaría tras la delección (334 pb). Dado que se trata de un *pool* de células, se observa el fragmento parental de 1.195 pb con todas las cantidades ensayadas (Fig. 29B). Por otro lado, se consigue el fragmento deseado (334 pb) en todas las muestras tras 48 h de transfección, aunque en las transfectadas con 100 y 400 ng de las guías G_1 y G_2 , respectivamente, se observa una mayor intensidad de la banda correspondiente. Esto se podría relacionar con un mayor número de células con el gen diana delecionado, razón por la cual se decidió emplear estas cantidades para la generación de una línea estable.

Para generar una línea estable, se sembraron células DF-1 en placas de 100 mm a una confluencia del 80% y se transfectaron con los distintos plásmidos. Para mantener la

proporción respecto a las células transfectadas en placas de 24 pocillos, se emplearon 2.800 ng de pG1, 11.200 ng de pG2, 28.000 de ng pCas9 y 2.800 ng de pEGFP-C1. Tras 48 h de transfección, las células transfectadas fueron seleccionadas por citometría de flujo en base a la expresión de la proteína GFP debida al plásmido pEGFP-C1. Estas células se sembraron a baja densidad para obtener colonias aisladas, y tras 1-2 semanas en cultivo se extrajeron diferentes clones. Los clones se amplificaron y se sometieron a análisis. En primer lugar, estos clones fueron analizados por *Western Blot* para investigar la expresión de la proteína PKR. En la Figura 30A se muestra una selección de 4 clones en los que no se observa expresión de PKR, a diferencia de lo que ocurre con el extracto celular procedente de unas células DF-1 WT, utilizado como control. A continuación, se hizo un análisis genético de estos clones. Para ello, las células fueron recogidas en tampón de lisis, se extrajo el DNA, y se analizó por PCR empleando nuevamente la pareja de cebadores F_1 - R_1 y el cebador F_1 en combinación con un nuevo cebador (R_2), que hibrida en la zona interna de la delección. El tamaño de los amplicones para cada par de cebadores, y la combinación de los mismos según el fenotipo resultante tras la delección, homocigoto o heterocigoto, se indican en la Figura 30B. Como se observa en la Figura 30C, únicamente el clon 3 presenta las características de homocigosis para la delección, ya que con el primer par de cebadores (F_1 - R_1) se consigue el tamaño del fragmento tras la delección (4.182 pb), y no se obtiene ningún fragmento al emplear el

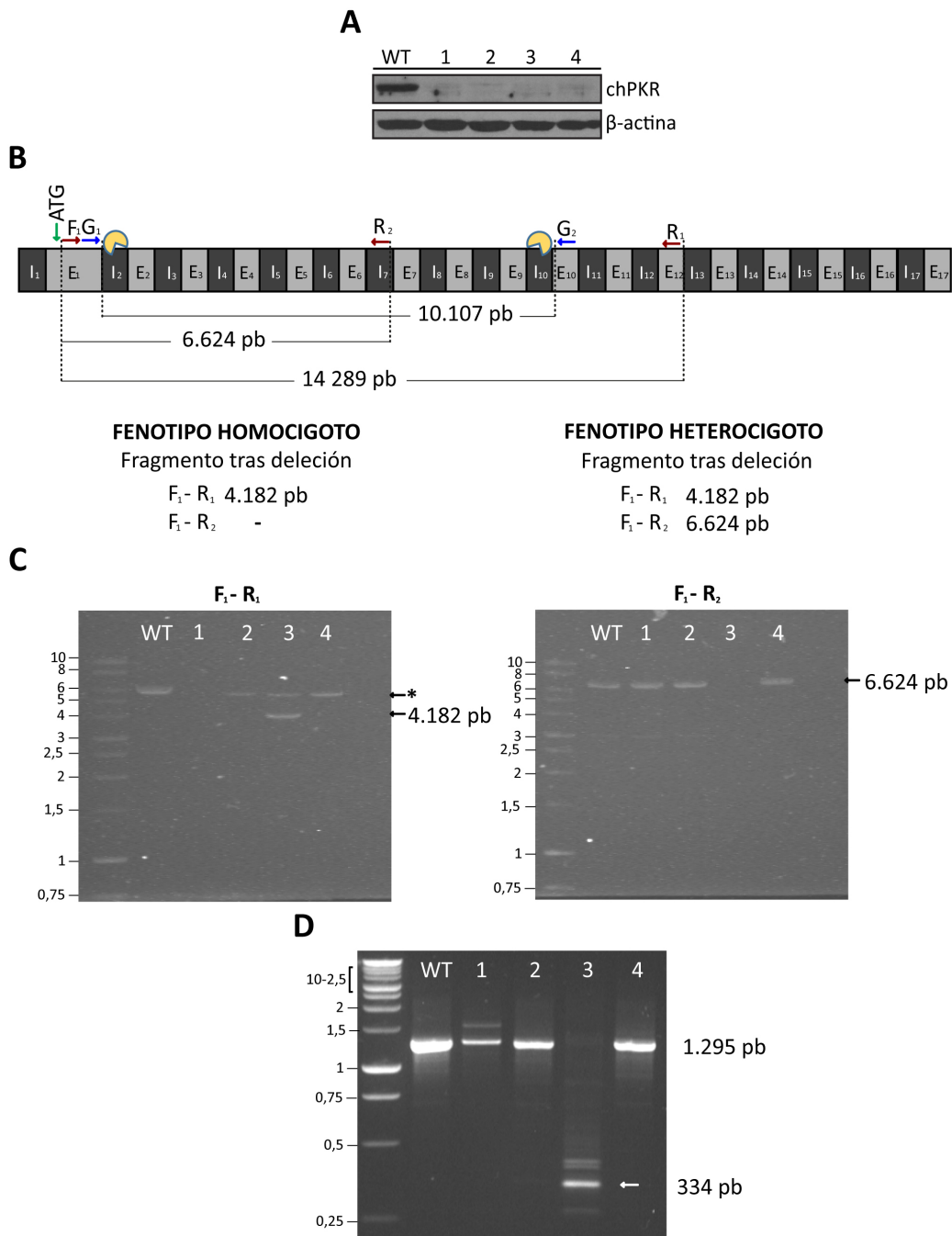


Figura 30

segundo par de cebadores (F₁-R₂). En ningún caso se ha conseguido amplificar el fragmento parental cuando se emplean los cebadores F₁-R₁

(14.289 pb), posiblemente por el gran tamaño de éste. Por otro lado, en el resto de los clones analizados, cuando se emplea la pareja F₁-R₂

Figura 30. Generación de una línea estable de células DF-1-PKR por la tecnología CRISPR-Cas9. Se sembraron células DF-1 en placas de 100 mm y se transfectaron con los siguientes plásmidos: 2.800 ng de pG1, 11.200 ng de pG2, 28.000 ng de pHCas9 y 2.800 ng de pEGFP-C1. A las 48 h p.t. las células que expresan la proteína GFP fueron seleccionadas por citometría de flujo, sembradas y clonadas. **A.** Análisis por *Western Blot* de la expresión de la proteína PKR en los clones seleccionados y en las células WT. **B.** Esquema del gen PKR de pollo donde se representan los intrones (cajas negras) y lo exones (cajas grises). Las flechas azules indican la zona de reconocimiento de las guías de RNA (G_1 - G_2) y las flechas rojas los cebadores empleados para discriminar entre los fenotipos de homocigosis y heterocigosis para la delección. Enzima Cas9 (amarillo). **C.** Se recogieron extractos celulares de los diferentes clones y de las células DF-1 WT (células no transfectadas), se extrajo DNA y se analizaron los clones mediante PCR con las parejas de cebadores F_1 - R_1 y F_1 - R_2 . Los fragmentos de DNA obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. **D.** Los extractos celulares se emplearon también para la purificación de RNA y su análisis por RT-PCR con la pareja de cebadores F_1 - R_1 . Los fragmentos de DNA obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. A la derecha de cada gel se indica el maracador de peso molecular (kb). (*) Banda inespecifica.

se consigue amplificar el fragmento parental de 6.624 pb, lo que indica que, o bien no se ha producido la delección, o que los clones 1, 2 y 4 presentan un fenotipo heterocigoto. No se consigue en ningún caso el fragmento de 4.182 para el fenotipo heterocigoto, posiblemente debido que en lugar de la delección deseada se ha producido un reordenamiento de la secuencia tras su reparación por recombinación del tipo no homóloga. En todos los estudios siguientes se ha empleado el clon 3 (DF-1-PKR) dado que no expresa la proteína PKR y es homocigoto para la delección. Para poder averiguar la razón por la que los clones 1, 2 y 4 no expresan PKR, a pesar de su fenotipo heterocigoto, se purificó el RNA total a partir de todos los clones y de células WT. Los RNAs se sometieron a RT, y los cDNAs resultantes se emplearon como moldes para la PCR con los cebadores F_1 - R_1 , siguiendo la estrategia detallada en la Figura 29A. La Figura 30D muestra la presencia de la banda parental de 1.295 pb en todos los casos excepto para el clon 3. Este presenta únicamente el tamaño de banda esperado tras la delección (334 pb), junto con otras bandas de un tamaño superior, originadas posiblemente por procesamiento alternativo. Para el caso

de los otros clones, podría ocurrir que no se produjera el correspondiente mRNA, que este no llegue a ser traducido a proteína, o que dé lugar a una proteína aberrante, que no es reconocida por el anticuerpo anti-PKR.

2.2.3.3. PKR participa parcialmente en la apoptosis desencadenada en células DF-1 por IBDV tras tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$

Una vez obtenida una línea celular estable de células DF-1 que no expresa PKR, se infectaron estas células, así como células DF-1 WT a una MOI de 2 UFP/célula y se trataron con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\alpha$ a 3 h p.i. Las muestras M, M+3, I e I+3 fueron recogidas a 8, 12 y 16 h p.i. La Figura 31 muestra el estudio de la actividad de las caspasas 3 y 7. En ambos casos, en las muestras I+3 se observa un incremento gradual en la actividad apoptótica a partir de las 8 h p.i., siendo máxima a las 16 h p.i. Sin embargo, este incremento es significativamente inferior en las células DF-1-PKR en los 3 tiempos analizados, llegando a ser dos veces menor a 16 h p.i. en estas células con respecto a las células DF-1 WT. Como se ha mencionado anteriormente, IBDV es capaz de inducir apoptosis en ausencia del tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$, aunque esta

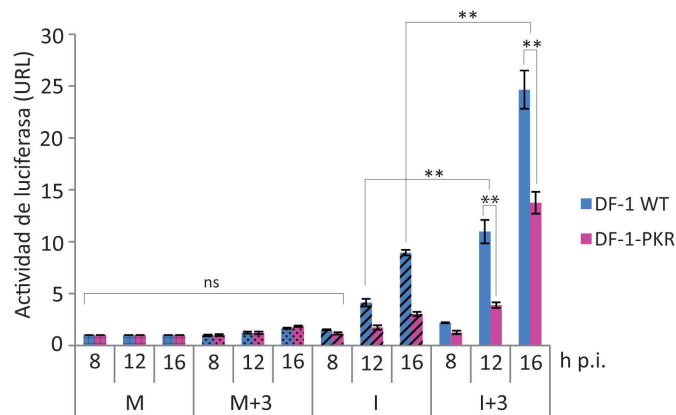


Figura 31. La apoptosis desencadenada en células DF-1 infectadas con IBDV en presencia de $\text{chIFN-}\alpha$ es parcialmente dependiente de la expresión de PKR. Células DF-1 WT y DF-1-PKR no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula fueron tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$ (1.000 U/ml) a 3 h p.i. (M+3 e I+3) y analizadas a los tiempos post infección indicados. Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Barras con entramado cuadrícula: células no infectadas (Mock); barras punteadas: células no infectadas tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (**) indican un $p < 0,01$, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

activación es claramente menor que la inducida en las muestras tratadas con IFN. No obstante, la reducción de la apoptosis en ausencia de PKR a 16 h p.i. no es tan drástica como en el caso de las células HeLa-PKR a 24 h p.i. (Fig. 9B). Esto sugiere que, aunque PKR desempeña un papel importante en la producción de apoptosis, en estas células existe una ruta alternativa que contribuye a la producción de apoptosis en ausencia de PKR.

2.2.4. LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *chIFNB* Y *chMDA5* EN CÉLULAS DF-1 INFECTADAS Y TRATADAS CON $\text{chIFN-}\alpha$ ES DEPENDIENTE DE PKR

Para continuar con la caracterización de los factores que intervienen en la producción de apoptosis desencadenada por la infección

viral en células DF-1 WT y células DF-1-PKR, estas células fueron infectadas a una MOI de 2 UFP/célula y tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$ (1.000 U/ml) a 3 h p.i. Las muestras M, M+3, I e I+3 fueron recogidas a las 12 y 16 h p.i. y sometidas a análisis por qRT-PCR. Las Figuras 32 y 33 muestran los análisis de los distintos genes examinados a 12 y 16 h p.i., respectivamente. Se puede observar la inducción de *chIFNB* en las muestras I a 12 h p.i. (Fig. 32), sin embargo, esta inducción se ve incrementada en 20 veces en las muestras I+3 en las células DF-1 WT. Cuando se analiza la expresión en células DF-1-PKR, se observa una reducción de casi 1 unidad logarítmica con respecto a las células DF-1 WT, tanto en las muestras I como en las I+3. A 16 h p.i. (Fig. 33), ambos tipos celulares muestran el mismo patrón de expresión que a 12 h, aunque

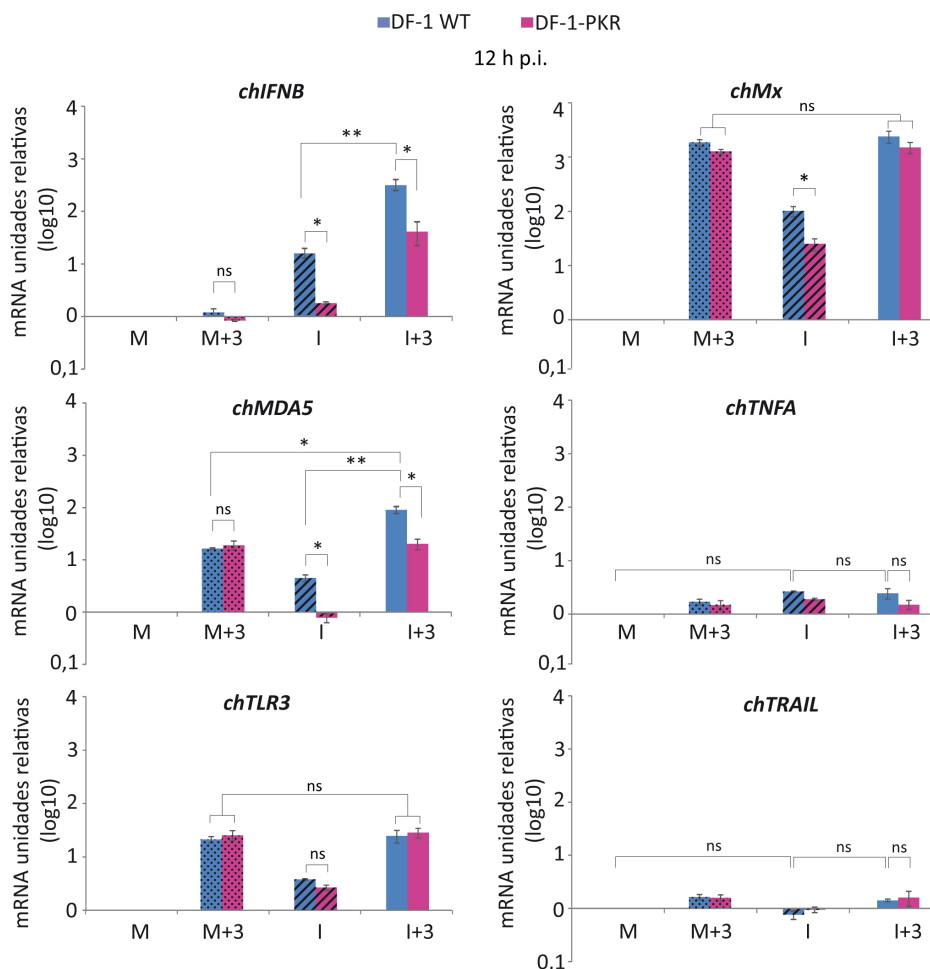


Figura 32. Análisis de la expresión génica a 12 h p.i. en células DF-1 infectadas con IBDV y tratadas con α -IFN. Células DF-1 WT y células DF-1-PKR no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 U/ml de α -IFN a 3 h p.i. (M+3 e I+3). Las células fueron recogidas a las 12 h p.i. y sometidas a extracción de RNA total para su estudio por qRT-PCR. La expresión de cada gen celular fue normalizada respecto al gen *GAPDH*. Los datos se representan en escala logarítmica (log10) como número de veces sobre el nivel de expresión en células no infectadas (Mock). Células DF-1 WT (barras azules) y células DF-1-PKR (barras rosas). Barras punteadas: células Mock tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas, representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

con mayores niveles de inducción.

Por otro lado, se quiso estudiar el papel de *MDA5* y *TLR3* en la producción de apoptosis. Estas dos proteínas, junto con RIG-I, son proteínas que actúan reconociendo dsRNA, activando de este modo la respuesta antiviral

(133). No obstante, las células de pollo carecen del gen que codifica RIG-I (134), por lo que en este contexto *MDA5* y *TLR3* cobran una gran importancia.

En las células DF-1 WT se puede observar una inducción significativa de *chMDA5*

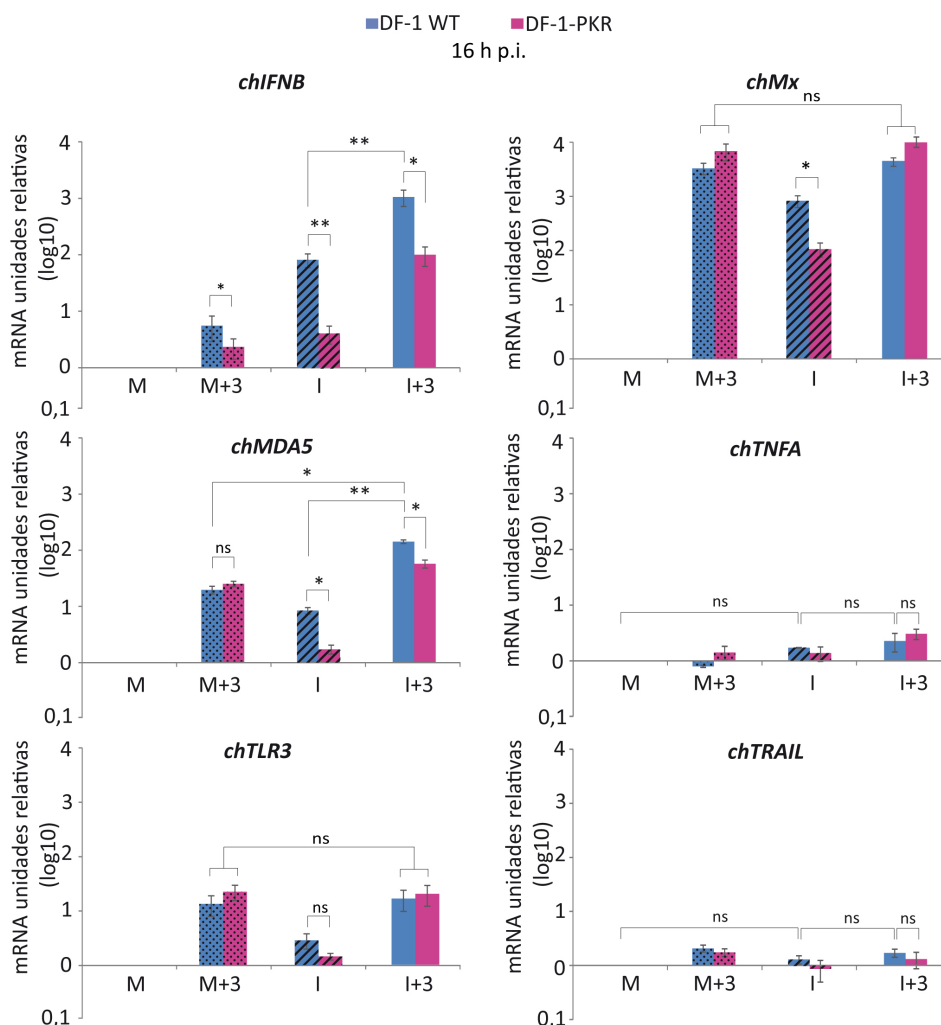


Figura 33. Análisis de la expresión génica a 16 h p.i. en células DF-1 infectadas con IBDV y tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$. Células DF-1 WT y células DF-1-PKR no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\alpha$ a 3 h p.i. (M+3 e I+3). Las células fueron recogidas a 16 h p.i. y sometidas a extracción de RNA total para su estudio por qRT-PCR. La expresión de cada gen celular fue normalizada respecto al gen *GAPDH*. Los datos se representan en escala logarítmica (log10) como número de veces sobre el nivel de expresión en células no infectadas (Mock). Células DF-1 WT (barras azules) y células DF-1-PKR (barras rosas). Barras punteadas: células Mock tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas, representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

de aproximadamente 7 y 20 veces en las muestras I+3 respecto a muestras M+3 e I, respectivamente, de forma independiente del tiempo analizado. Nuevamente se puede distinguir una reducción de la expresión de

chMDA5 en las células DF-1-PKR de hasta 5 veces en las muestras I e I+3 respecto a la inducción observada en células WT, independientemente del tiempo de recogida. Parece ser que la inducción de *chMDA5* es dependiente de PKR

solo en el contexto de la infección, ya que en las muestras M+3 no existen variaciones significativas en la expresión entre ambos tipos de células a ninguno de los tiempos ensayados. Por otro lado, las expresiones de *chTLR3* y de *chMx* inducidas por el tratamiento con IFN, fueron similares tanto en las células no infectadas como en las infectadas, en cualquiera de los tiempos analizados. No obstante, la expresión de *chMx* en las muestras I fue reducida aproximadamente en 4 y 7 veces a 12 y 16 h p.i. respectivamente en las células DF-1-PKR respecto a las células DF-1 WT. Al igual que en el caso de MDA5, esto podría indicar que su expresión es dependiente de PKR solo en el contexto de la infección. Por otro lado, se estudió la expresión de los genes

pro-apoptóticos *chTNFA* y *chTRAIL*, pero no se observó una modificación significativa en la expresión de dichos genes en ninguna de las condiciones ensayadas.

Cuando se analiza la replicación del RNA y el título viral se observa una reducción de aproximadamente 1 unidad logarítmica en las muestras I+3 respecto a las muestras I, tanto en células WT como en células DF-1-PKR (Fig. 34A y B). Con respecto a la expresión de la proteína VP3, la reducción en las muestras I+3 es evidente (Fig. 34C). Estos datos indican que el IFN produce un cierto bloqueo de la infección de IBDV a nivel de la replicación viral, que es independiente de PKR. Por tanto, al igual que sugieren los datos en las células HeLa (Fig. 9C, 11A-B), en las DF-1 en presencia de *chIFN-α*

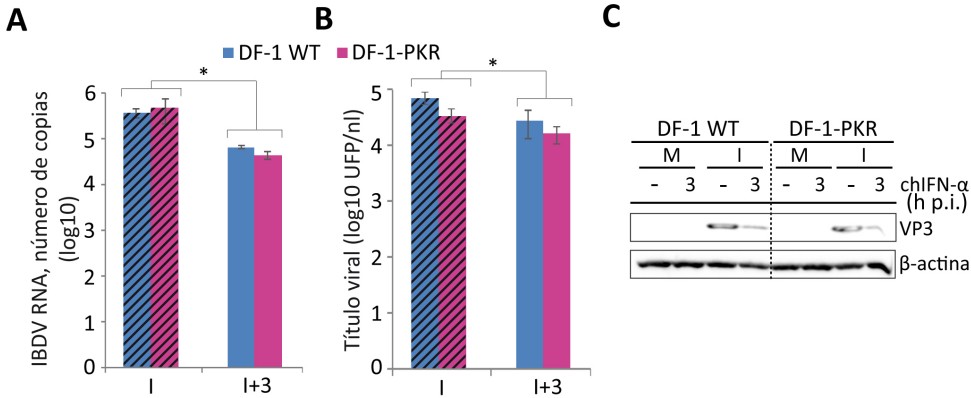


Figura 34. PKR no es la responsable de bloquear la progresión de la infección de IBDV en células DF-1 infectadas y tratadas con *chIFN-α*. Células DF-1 WT y células DF-1-PKR no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 U/ml de *chIFN-α* a 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a las 16 h p.i. **A.** Los extractos celulares fueron sometidos a extracción de RNA total para su análisis por qRT-PCR. El RNA viral fue analizado empleando cebadores que hibridan el segmento genómico A, en la zona que codifica para la proteína VP3. Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. **B.** Titulación del virus extracelular en los sobrenadantes. Los datos se representan en escala logarítmica (log10). **C.** Análisis por *Western Blot* empleando el anticuerpo contra la proteína viral VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) indican un $p < 0,05$, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

debe actuar otro factor celular, diferente a PKR, que inhibe parcialmente la replicación viral.

2.3. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR IBDV EN CÉLULAS DT40 BAJO EL TRATAMIENTO CON $\text{chIFN-}\alpha$ Y $\text{chIFN-}\gamma$

Como se ha comentado en la introducción, *in vivo*, IBDV infecta fundamentalmente linfocitos B en la bolsa de Fabricio. Por otra parte, la secreción de $\text{chIFN-}\gamma$ por linfocitos T que llegan a la bolsa de Fabricio durante la infección por IBDV ha sido descrita previamente (3). Por todo ello, decidimos utilizar la línea celular de linfocitos B, DT40, para corroborar los resultados obtenidos en las células HeLa y DF-1, y estudiar el efecto del tratamiento con $\text{chIFN-}\gamma$ además del tratamiento con $\text{chIFN-}\alpha$.

Se empleó un $\text{chIFN-}\gamma$ comercial, por lo que en primer lugar se analizó su actividad y capacidad antiviral mediante un ensayo de funcionalidad biológica. Para ello, células DT40 fueron tratadas durante 16 h con concentraciones crecientes de $\text{chIFN-}\gamma$. Posteriormente estas células fueron infectadas con el virus NDV-GFP a una MOI de 1 UFP/célula y recogidas a 24 h p.i. para la medida de la fluorescencia de la proteína GFP. Como indica la Figura 35A, con la concentración de 1.000 U/ml se consiguió una reducción de un 70% de la infección. A concentraciones menores el efecto protector frente a la infección por NDV-GFP es menor. Una vez llevado a cabo el estudio de la actividad del $\text{chIFN-}\gamma$ comercial, se analizó la sensibilidad de IBDV a la acción antiviral de este tipo de IFN y de $\text{chIFN-}\alpha$ en células DT40,

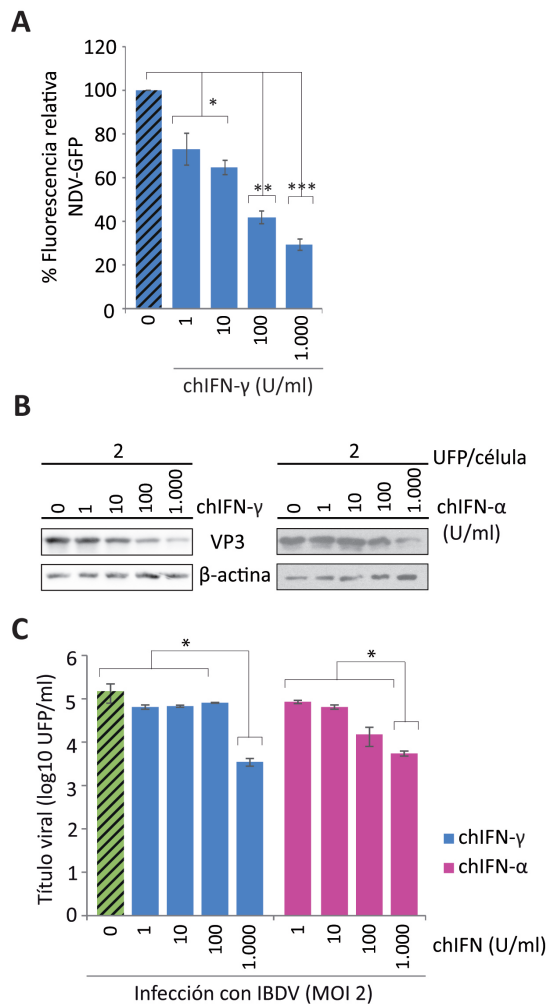


Figura 35. Ensayo de la actividad biológica del $\text{chIFN-}\gamma$ comercial. Células DT40 fueron tratadas durante 16 h con diluciones seriadas de $\text{chIFN-}\gamma$. Posteriormente se infectaron con NDV-GFP a una MOI de 1 UFP/célula (**A**) o con IBDV a una MOI de 2 UFP/célula (**B-C**), y se recogieron a las 24 h p.i. **A**. Se cuantificó la señal de fluorescencia y los datos fueron relativizados respecto a las células sin tratar (barras con patrón de rayas). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas correspondientes a dos experimentos independientes. **B**. Análisis por *Western Blot* empleando el anticuerpo contra la proteína viral VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. **C**. Titulación del virus extracelular en los sobrenadantes. Los datos se representan en escala logarítmica (log₁₀). Los asteriscos (*), (**) y (***) indican un $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

en ensayos de pretratamiento. Como se puede observar en la Figura 35B, la expresión de la proteína viral VP3 se reduce en gran medida con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\gamma$ o $\text{chIFN-}\alpha$, aunque esta reducción no es total como en el caso de células HeLa o DF-1 pretratadas con $\text{hIFN-}\alpha$ o $\text{chIFN-}\alpha$ respectivamente (Fig. 11A y Fig. 27), indicando una menor sensibilidad de las células DT40 a la acción antiviral de ambos tipos de IFN. Del mismo modo, cuando se analizan los títulos de virus extracelular, estos se reducen 40 y 20 veces cuando las células son pretratadas con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\gamma$ o $\text{chIFN-}\alpha$, respectivamente (Fig. 35C). Dado que con 1.000 U/ml de cada uno de los IFNs se observó la mayor reducción de la infección, se decidió emplear esta concentración para los

siguientes experimentos.

2.3.1. EL TRATAMIENTO CON $\text{chIFN-}\alpha$ O $\text{chIFN-}\gamma$ EN CÉLULAS DT40 INFECTADAS POR IBDV CAUSA APOPTOSIS

A continuación, se investigó si el tratamiento con ambos tipos de chIFN en células DT40, tras la infección con IBDV, causaba apoptosis al igual que en células HeLa y DF-1. Con este objetivo, células DT40 fueron infectadas a una MOI de 2 UFP/célula y tratadas a 3 h p.i. con $\text{chIFN-}\alpha$ o $\text{chIFN-}\gamma$. Las muestras M, M+3, I e I+3 fueron recogidas a 12, 16 y 24 h p.i. para su posterior análisis mediante el kit *Caspase-Glo 3/7 assay kit*. Como se puede observar en la Figura 36A, en estas células el virus apenas causa apoptosis en ausencia de IFN en los tiempos ensayados.

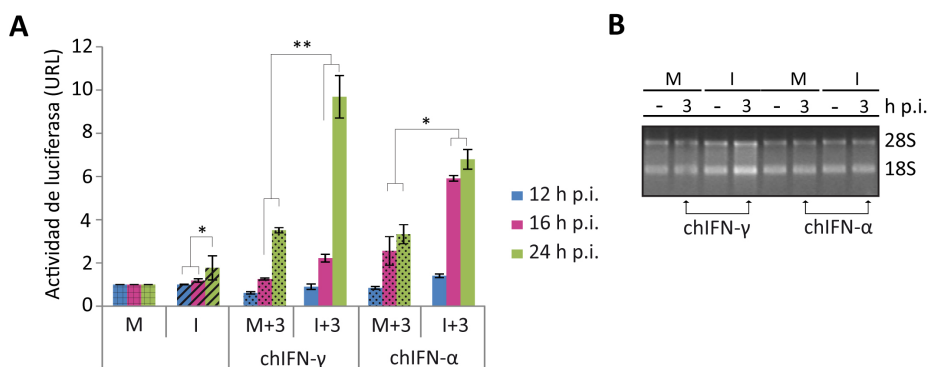


Figura 36. Los tratamientos con $\text{chIFN-}\gamma$ y $\text{chIFN-}\alpha$ en células DT40 infectadas por IBDV causa apoptosis. Células DT40 no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2 UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\alpha$ o de $\text{chIFN-}\gamma$ a las 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a los tiempos que se indican. **A.** Determinación de la apoptosis mediante el reactivo *Caspase-Glo 3/7*. La actividad de las caspasas 3 y 7 se expresó en unidades relativas de luminiscencia (URL), una vez relativizados los valores frente a los obtenidos en las células no infectadas (Mock) recogidas a 12, 16 o 24 h p.i. **B.** Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa del RNA ribosómico (rRNA) de muestras recogidas a las 24 h p.i. A la derecha de la figura se indica el tamaño de los rRNA (28S y 18S). Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Barras con entramado cuadrado: células no infectadas (Mock); barras punteadas: células no infectadas tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado.

Sin embargo, ambos tipos de *chIFN* inducen apoptosis a 16 y 24 h p.i. en las muestras I+3. A 12 h p.i. no se observa actividad de las caspasas, indicando que la apoptosis en estas células, bajo estas condiciones, se inicia entre las 12 y 16 h p.i., de forma similar a lo que ocurre en las células HeLa (Fig. 17B). A 16 h p.i., la apoptosis inducida por *chIFN-α* en las muestras I+3 es aproximadamente 3 veces mayor que la inducida por *chIFN-γ*. Sin embargo, a 24 h p.i., la actividad de las caspasas 3 y 7 es mayor bajo el tratamiento con *chIFN-γ*.

Nuevamente, al analizar muestras de RNA de estas células se observó la integridad de los rRNA 28S y 18S (Fig. 36B), indicando que, en estas células, la enzima RNasaL tampoco desempeña un papel importante en la producción de apoptosis bajo ninguna de las condiciones ensayadas.

2.3.2. EL TRATAMIENTO CON *chIFN-α* O *chIFN-γ* EN CÉLULAS DT40 INFECTADAS POR IBDV INDUCE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *chIFNB*

Nuevamente se analizó el perfil de expresión de posibles genes implicados en la apoptosis inducida en las células DT40 infectadas con IBDV bajo el tratamiento con *chIFN-α* y *chIFN-γ*. De esta forma, infectamos células DT40 a una MOI de 2 UFP/célula y las tratamos con *chIFN-α* o *chIFN-γ* a 3 h p.i. Las muestras M, M+3, I e I+3 fueron recogidas a 24 h p.i., ya que a este tiempo se observó una gran actividad de las caspasas, y fueron analizadas por qRT-PCR. Como indica la Figura 37, en las muestras I+3 tratadas tanto con *chIFN-α* como con *chIFN-γ* se induce la expresión de *chIFNB*, no

observándose diferencias significativas entre las muestras tratadas con cada uno de los IFNs. Con *chIFN-α* la inducción de *chIFNB* es 18 y 34 veces mayor respecto a los niveles alcanzados en las muestras M+3 e I, respectivamente. Con *chIFN-γ* la inducción en las muestras I+3 es 77 veces mayor respecto a las muestras I, sin embargo, entre I+3 y M+3 la diferencia es de 4 veces. En el caso del gen *chMx*, en las muestras I+3 el *chIFN-γ* provoca una inducción hasta 6 veces superior a la observada en las muestras M+3 tratadas con el mismo IFN, mientras que no existen diferencias significativas entre las muestras M+3 e I+3 tratadas con *chIFN-α*. Respecto a la expresión del gen *chMDA5*, el tratamiento con *chIFN-γ* no induce diferencias significativas entre las muestras M+3 e I+3. Sin embargo, el tratamiento con *chIFN-α* induce pequeñas diferencias, aunque estadísticamente significativas, entre las muestras M+3 e I+3. En estas células *chTLR3* solo se induce tras el tratamiento con *chIFN-α*, y, al igual que en las células DF-1, no muestra un perfil de expresión diferencial entre las muestras M+3 e I+3. Por último, los genes *chTNFA* y *chTRAIL* no presentan una expresión diferencial bajo ninguna de las condiciones ensayadas, al igual que en las células DF-1, y a diferencia de las células HeLa, lo que indica que otra proteína pro-apoptótica podría estar involucrada en la ejecución de la apoptosis en células de pollo. Por otro lado, no se observan diferencias significativas en los valores de RNA viral, ni en los títulos de virus, entre las muestras I e I+3, independientemente del *chIFN* empleado (Fig. 38A, B). Del mismo modo, cuando se analizan los

extractos celulares por *Western Blot* (Fig. 38C), no se observa una disminución en la expresión de VP3 en las muestras tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$ o con $\text{chIFN-}\gamma$, con respecto a las células sin tratar. Estos resultados, junto con los obtenidos

en los ensayos de pretratamiento de las células con IFN, indican la escasa sensibilidad de IBDV a la acción antiviral a ambos chIFNs en estas células.

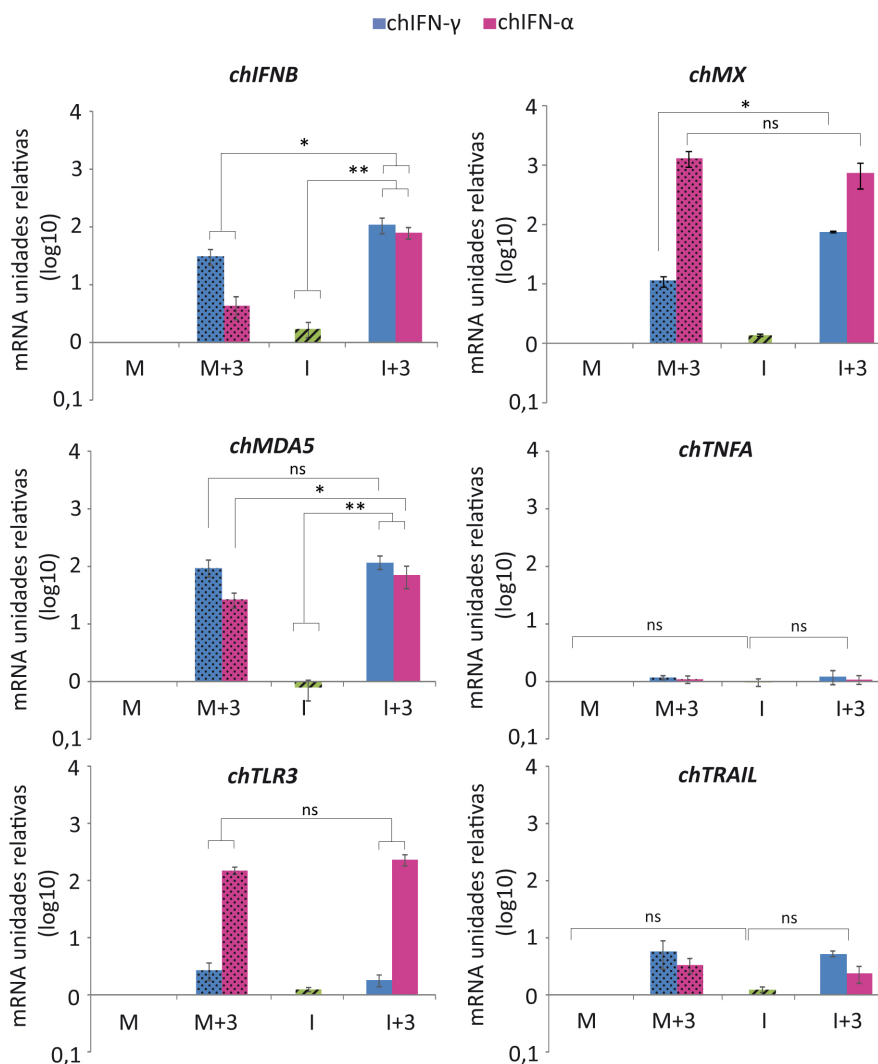


Figura 37. Análisis de la expresión génica por qRT-PCT en células DT40 infectadas con IBDV y tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$ o $\text{chIFN-}\gamma$. Células DT40 no infectadas (M) o infectadas (I) con IBDV (MOI 2UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 U/ml de $\text{chIFN-}\alpha$ o de $\text{chIFN-}\gamma$ a las 3 h p.i. (M+3 e I+3). Las células fueron recogidas a las 24 h p.i. y sometidas a extracción de RNA total para su estudio por qRT-PCR. La expresión de cada gen celular fue normalizada respecto al gen *GAPDH*. Los datos se representan en escala logarítmica (\log_{10}) como número de veces sobre el nivel de expresión en células no infectadas (Mock). Barras punteadas: células no infectadas (Mock) tratadas con IFN; barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) y (**) indican un $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, determinado a partir de una prueba t-Student del tipo no pareado. ns: no significativo.

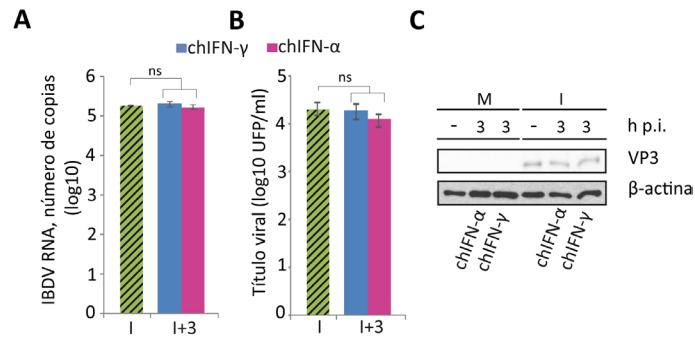


Figura 38. IBV no es sensible a la acción antiviral de chIFN-α y chIFN-γ en células DT40 infectadas y tratadas con dichos IFNs. Células DT40 no infectadas (M) o infectadas (I) con IBV (MOI 2UFP/célula) fueron tratadas con 1.000 U/ml de chIFN-α o de chIFN-γ a las 3 h p.i. (M+3 e I+3) y recogidas a las 24 h p.i. **A.** Los extractos celulares fueron sometidos a extracción de RNA total para su análisis por qRT-PCR. La replicación viral fue analizada empleando cebadores que hibridan en el segmento genómico A, en la zona que codifica la proteína VP3. Barras de rayas: células infectadas sin tratamiento con IFN; barras de color sólido: células infectadas y tratadas con IFN. Cada barra corresponde a la media \pm la desviación estándar de dos réplicas de un experimento representativo de tres experimentos independientes. ns: no significativo. **B.** Titulación del virus extracelular en los sobrenadantes. Los datos se representan en escala logarítmica (log10). **C.** Análisis por *Western Blot* empleando el anticuerpo contra la proteína viral VP3. La proteína β -actina se utilizó como control de carga.

DISCUSIÓN

La infección por IBDV se caracteriza por la muerte masiva de linfocitos B inmaduros en la bolsa de Fabricio. Esto provoca un estado de inmunosupresión que puede desencadenar la muerte del animal infectado, o en el caso de que este sobreviva, conducirá a una mayor susceptibilidad a infecciones por patógenos secundarios. Sin embargo, a día de hoy no se conocen los mecanismos moleculares que subyacen a esta patología. Van den Berg y colaboradores (2) proponen que una respuesta apoptótica, junto con la producción de una tormenta de citoquinas proinflamatorias podrían ser las responsables de la pérdida dramática de células B.

La función mejor caracterizada del IFN es la inducción de un estado antiviral tanto en células infectadas como en células vecinas no infectadas, a través de la expresión de una gran variedad de ISGs. No obstante, se ha descrito que el IFN puede inducir la muerte de las células infectadas, posiblemente con la finalidad delimitar la diseminación del virus en cuestión (135). Esta característica dual del IFN ha sido estudiada y demostrada en diferentes infecciones virales, donde la producción sistémica de IFN tipo I ha sido claramente correlacionada con la inducción de inmunosupresión y el agravamiento de la sintomatología de la enfermedad. Los virus HIV (136), LCMV (virus de la coriomeningitis linfocitaria) (137, 138), CSFV (virus de la peste porcina clásica) (139), NDV (140), AIV (virus de la gripe aviar) (141) y SARS-CoV (virus del síndrome respiratorio agudo) (142) son

ejemplos representativos de esta estrecha relación entre la respuesta de IFN y el rigor de la sintomatología clínica de la enfermedad.

Existen algunos estudios realizados acerca del efecto de IFN tipo I sobre la infección por IBDV, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (121, 143). Sin embargo, de momento no existe información sobre la posible contribución directa del IFN a la patogenia desencadenada por IBDV. Por ello, en este trabajo nos propusimos como objetivo principal estudiar el efecto del IFN sobre la infección por IBDV en distintos sistemas celulares.

1. EFECTO DEL IFN SOBRE LA INFECCIÓN POR IBDV EN CÉLULAS HeLa

La utilización de la línea celular HeLa como modelo inicial se basa en posibilidad de realizar un estudio exhaustivo de los factores celulares implicados en la interacción del virus con la respuesta innata celular, debido a la existencia de reactivos específicos, no disponibles en otros sistemas celulares, como es el caso de las células de pollo. Además, esta línea celular se ha utilizado previamente para estudiar distintos aspectos del ciclo replicativo de IBDV (33).

De acuerdo con estudios previos realizados en células de pollo tratadas con $\text{chIFN-}\alpha$ (143), nuestros resultados demuestran que el pretratamiento con IFN- α en células HeLa interfiere con la expresión de la proteína viral VP3, utilizada como marcador de la infección, y con la replicación del virus, de una manera dependiente de la dosis de IFN. Otros miembros de la familia *Birnaviridae* también

muestran una sensibilidad a la acción antiviral del IFN. Tal es el caso del virus IPNV, con el que se ha observado que se produce una reducción de la síntesis proteica y de la producción de la progenie viral en cultivos celulares tratados con IFN- α de salmón (144).

1.1. EL TRATAMIENTO CON IFN EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS POR IBDV INDUCE UNA RESPUESTA APOPTÓTICA DEPENDIENTE DE PKR

Nuestros resultados han puesto de manifiesto, por primera vez, que la administración de IFN- α después del inicio de la infección por IBDV conduce a la muerte celular por apoptosis mediada por caspasas. El efecto apoptótico es mayor cuando el IFN se añade a tiempos tempranos post infección (3-6 h) que cuando se añade a tiempos tardíos (9-12 h p.i.). Además, es dependiente de la dosis de IFN, ya que por debajo de 100 UI/ml de esta citoquina no se observó efecto alguno. Sin embargo, a partir de esta cantidad, la inducción de apoptosis fue similar en todos los casos, observándose pequeñas diferencias no significativas. Por otra parte, también se observa un efecto antiviral del IFN, observado tanto por la menor acumulación de la proteína viral VP3, como por la disminución de los títulos virales, y este efecto también es más evidente cuando el IFN se añade a tiempos tempranos p.i. Por otro lado, hemos comprobado que tanto los IFNs de tipo I, IFN- α e IFN- β , como el IFN de tipo II, IFN- γ , son capaces de desencadenar la muerte de las células infectadas y de ejercer un efecto antiviral. En los animales infectados se

producen los tres tipos de IFN, y en concreto, la producción de IFN- γ se ha asociado con la patogenia causada por IBDV (47).

La activación de la respuesta apoptótica por parte del IFN puede ser considerada como un mecanismo de protección que limita la diseminación del virus, no obstante, como se ha mencionado anteriormente, existen ejemplos que señalan que este fenómeno también puede contribuir a la patogenia causada por diferentes virus (141, 142).

En base a estos antecedentes, quisimos determinar el mecanismo que dispara la activación de la apoptosis en las células infectadas por IBDV tras el tratamiento con IFN. Para ello se analizó el patrón de expresión proteica de tres ISGs bien caracterizadas en células HeLa: Mx, ISG-56 y PKR. Mx e ISG-56 no parecen estar implicadas en la inducción de apoptosis bajo estas condiciones dado que su patrón de expresión no varía entre células infectadas y no infectas. En cambio, la proteína PKR se encuentra activada únicamente en las células infectadas y tratadas con IFN, a pesar de que la cantidad total de esta proteína es menor en estas células. Esta reducción podría deberse a una inhibición de la traducción del mRNA que codifica PKR o a un mayor turnover de esta proteína en las células infectadas y tratadas con IFN, ya que en estas células los niveles de mRNA son similares a los de las células no infectadas tratadas con IFN. La activación de PKR se correlaciona directamente con la fosforilación de eIF2 α , con una importante reducción de la acumulación de VP3 y con la magnitud de la actividad apoptótica. Como

ya se mencionó anteriormente, PKR está involucrada en la inducción de apoptosis por diferentes mecanismos, siendo uno de ellos a través de la fosforilación eIF2 α (145).

Mediante el uso de células HeLa en las que la expresión de PKR está silenciada de forma estable, comprobamos que la respuesta apoptótica en las células infectadas con IBDV y tratadas con IFN se reduce drásticamente en ausencia de PKR. Además, en estas células tampoco observamos fosforilación de eIF2 α . Por tanto, estos resultados demuestran que PKR juega un papel crítico como mediador de la apoptosis en las células HeLa bajo estas condiciones. Por otro lado, aunque hay otras quinasas que pueden fosforilar a eIF2 α (146), estos resultados indican que PKR es la quinasa encargada de la fosforilación de este factor de traducción en estas condiciones. No obstante, los niveles de expresión de las proteínas analizadas, tanto celulares como la proteína viral VP3, no varían en ausencia de PKR. Esto sugiere que en este caso eIF2 α no participa en la inducción de apoptosis a través de la inhibición de la traducción. Sin embargo, sería necesario profundizar en estos estudios para determinar con certeza si eIF2 α participa en la inducción de la respuesta apoptótica a través de PKR.

Por otro lado, la reducción de la acumulación de VP3 y de RNA viral en las células infectadas y tratadas con IFN no puede relacionarse con la activación de PKR, ya que se encuentran perfiles similares de VP3 y de RNA viral en presencia o ausencia de PKR. Esto sugiere que PKR no afecta a la replicación del RNA viral,

al igual que ocurre en el caso del virus SFV (*Semliki Forest Virus*), donde se ha visto que en las infecciones por este virus la ausencia del gen de PKR no modifica la cantidad de RNA viral (147), si bien en ese caso se observa un retraso en la expresión de las proteínas virales. No obstante, en las células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN observamos que el título de virus extracelular se ve reducido en ausencia de PKR. En este sentido, experimentos llevados a cabo en células de salmón infectadas con IPNV, señalan que el uso de un inhibidor de PKR reduce la carga viral extracelular. Los autores relacionan este efecto con un menor daño en la membrana celular y un retraso en la aparición de efecto citopático, debido a la inhibición de PKR (148). Por tanto, se podría pensar que la falta de expresión de PKR en estas células llevaría a un retraso en la liberación de la progenie viral, y no a una reducción de la misma, como también sugiere el hecho de que el patrón de acumulación intracelular de VP3 y la cantidad de RNA viral son parecidos en presencia y ausencia de PKR. No obstante, se requiere un análisis más exhaustivo para confirmar o descartar esta hipótesis.

La acumulación de la proteína viral VP3 muestra un patrón inversamente proporcional a los niveles de expresión de Mx e ISG-56. Estos datos sugieren que en ausencia de PKR, estas proteínas podrían ser las responsables de la sensibilidad de IBDV cuando el IFN es añadido a tiempos tempranos p.i. En este sentido, se ha descrito que la proteína humana MxA inhibe la replicación de IBDV, aunque se

desconoce el mecanismo (149). Además, se ha demostrado que la proteína Mx de salmón reduce la replicación del birnavirus IPNV (150). No obstante, no podemos descartar la participación de otras ISGs no analizadas en este estudio.

1.2. LA INDUCCIÓN DE IFN- β , QUE ES DEPENDIENTE DE PKR, NO CONTRIBUYE A LA RESPUESTA APOPTÓTICA EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS Y TRATADAS CON IFN

Durante el desarrollo de este trabajo se observó un incremento en la expresión del gen *IFNB* en las células infectadas y tratadas con IFN con respecto a los niveles hallados en las células simplemente infectadas. Además, esta inducción es gradual y solapa en el tiempo con la fosforilación de PKR y con el incremento de la actividad de las caspasas 3 y 7 hasta las 24 h p.i. Sin embargo, en las células que no expresan PKR la expresión del gen *IFNB* experimenta un incremento mínimo, indicando una clara regulación del mismo dependiente de PKR. Relacionado con estos resultados, existe abundante información que indica que la activación de PKR contribuye a la inducción de IFN tipo I en respuesta a algunas infecciones virales (151-153).

Por otro lado, las células infectadas en ausencia del IFN muestran tan solo una ligera inducción de *IFNB* a las 24 h p.i., que se correlaciona con una falta de activación de PKR y de las caspasas 3 y 7. Sin embargo, a tiempos tardíos p.i. (40-48 h.p.i.) se observa un incremento progresivo de la

expresión del gen *IFNB*, lo que a su vez coincide con la fosforilación de PKR a estos tiempos y la inducción de apoptosis. El estudio cuantitativo a tiempo real, empleando el sistema *IncuCyte Zoom System*, señala que la infección por IBDV de las células HeLa causa apoptosis a tiempos tardíos p.i. en los que el ciclo viral ha finalizado, como demuestra la disminución de la carga de RNA viral.

Estos resultados indican por lo tanto que el tratamiento con IFN acelera la apoptosis en las células infectadas con IBDV. En el contexto de la infección *in vivo* la secreción de IFN por parte de linfocitos T y macrófagos tiene lugar durante estadios tempranos de la infección, y, por tanto, de acuerdo a nuestros resultados, este sería responsable de la muerte temprana de los linfocitos B por apoptosis. Por otro lado, la apoptosis inducida por el virus a tiempos tardíos en ausencia del tratamiento con IFN podría deberse al efecto del IFN secretado por las propias células infectadas, contribuyendo así a maximizar el efecto apoptótico.

Siguiendo en esta línea, quisimos investigar si la inducción de IFN- β contribuía a la respuesta apoptótica. Los resultados del silenciamiento de MAVS indican, por un lado, que la inducción de IFN- β ocurre principalmente a través del grupo de sensores citoplasmáticos RLR, los cuales señalizan de forma obligatoria a través de esta proteína adaptadora. No obstante, no podemos descartar la contribución de los receptores TLR en esta inducción. Por otro lado, se ha descrito que MAVS participa en la inducción de apoptosis a través de la activación de la caspasa 9 en el contexto de la infección

por el virus Sendai (130). Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar una nula aportación de MAVS a la activación de apoptosis. Esto lleva a pensar que la expresión de IFN- β no participa, al menos de forma directa, en la apoptosis inducida en las células infectadas con IBDV y tratadas con IFN en nuestro sistema *in vitro*, ya que en este contexto la aportación de IFN exógeno supliría el efecto del IFN- β secretado tras la infección. Sin embargo, en el contexto de la infección *in vivo* podría contribuir a retroalimentar el sistema, causando la muerte de otros linfocitos recién infectados. Además, el IFN- β podría contribuir a la producción de otros tipos de IFN, maximizando la inducción de la apoptosis (154, 155).

1.3. TNF- α Y NF- κ B MEDIAN LA RESPUESTA APOPTÓTICA EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS Y TRATADAS CON IFN

Para seguir indagando en el mecanismo de inducción de apoptosis en el contexto de la infección con IBDV tras el tratamiento con IFN- α , se estudió el efecto del mismo sobre la expresión de moléculas pro- y anti-apoptóticas. El resultado del análisis de expresión por qRT-PCR sugiere que la apoptosis desencadenada en las células HeLa podría ser disparada a través de TNF- α , pero no a través de la señalización mediada por TRAIL o Fas. TNF- α estaría actuando en la ruta apoptótica dependiente de PKR, mediando posiblemente la eliminación de las células infectadas por IBDV. Esta hipótesis se ve afianzada por el hecho de que el silenciamiento de la expresión de TNF- α en estas células elimina la respuesta apoptótica,

demostrado por la reducción de la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7, y la consecuente ausencia de procesamiento de la proteína PARP. Una situación similar se ha observado en la infección con el virus SARS-CoV (coronavirus del síndrome respiratorio agudo), donde se ha descrito que TNF- α podría actuar, de manera directa o indirecta, en la inducción de apoptosis en linfocitos T, descartando la participación de las rutas a través de FasL/Fas y TRAIL/DR5 (142).

Como ya se ha mencionado en el apartado de Introducción, PKR es capaz de activar a NF- κ B, el cual es requerido en la inducción de IFN- β . Este factor de transcripción juega un papel relevante en muchas funciones fisiológicas, como la adhesión celular, la diferenciación o la apoptosis (156). En las células infectadas y tratadas con IFN, se observa una activación transitoria de NF- κ B a partir de las 15 h p.i. Esta activación, determinada en base a la translocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B, coincide en el tiempo con la fosforilación de PKR y la activación de la apoptosis. A pesar de que NF- κ B se caracteriza por su papel en la proliferación celular, su participación en la inducción de apoptosis en células HeLa, al igual que en linfocitos B y T, ha sido previamente documentada (157-159). Sin embargo, la simple activación de NF- κ B no es suficiente para provocar la muerte celular, requiriendo de más factores para disparar la respuesta apoptótica (158).

En este trabajo se demuestra que el uso del inhibidor de NF- κ B, MG132, reduce drásticamente la apoptosis inducida en las

células infectadas con IBDV y tratadas con IFN, indicando la contribución de NF- κ B en la producción de esta muerte celular. Además, dada la inducción de TNF- α , el sistema de retroalimentación que existe entre TNF- α y NF- κ B podría estar operando en la apoptosis inducida en las células HeLa infectadas y tratadas con IFN- α . Por otra parte, los resultados del silenciamiento de MAVS indican que la activación de NF- κ B no estaría mediada a través de esta proteína mitocondrial. Así, mientras que la inhibición de NF- κ B reduce la actividad de las caspasas 3 y 7, el silenciamiento de MAVS no modifica la respuesta apoptótica.

1.4. CONTRIBUCIÓN DE LA RUTA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA EN LA APOPTOSIS DESENCADENADA EN CÉLULAS HeLa INFECTADAS Y TRATADAS CON IFN

Nuestros resultados de expresión génica por qRT-PCR señalan que ni *BAK* ni *BCL2* muestran un patrón de expresión diferencial en las células infectadas y tratadas con IFN con respecto a las células no infectadas y tratadas con IFN. Esto indica que la ligera inducción de *BAK* tras el tratamiento con esta citoquina no sería, al menos por sí misma, responsable de la respuesta apoptótica. Sin embargo, no podemos descartar su participación, ya que, tanto la ruta extrínseca como la intrínseca participan en la apoptosis activada bajo estas condiciones experimentales, como se demuestra al analizar la actividad de las caspasas efectoras 8 y 9, respectivamente, y mediante la utilización de inhibidores específicos de dichas caspasas.

Nuestros resultados indican que la contribución de la ruta extrínseca es predominante sobre la ruta mitocondrial, ya que se produce una activación más tardía de esta última y una menor inhibición de la apoptosis cuando se emplea un inhibidor de la ruta intrínseca. Además, sugieren que ambas rutas podrían estar interconectadas a través de la proteína Bid, como es el caso de la apoptosis inducida por miembros de la familia *Reoviridae* (160) o miembros del orden *Nivovirales* como el virus PRRSV (*Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (161) o el virus BEV (*Berne virus*) (162). Sin embargo, la activación de la ruta intrínseca podría también estar mediada por otros factores pro-apoptóticos como Bax o Bak, sin embargo, hasta el momento no hemos conseguido comprobar o descartar su participación.

1.5. dsRNA GENÓMICO DE IBDV COMO INDUCTOR DE LA APOPTOSIS

En ningún caso el tratamiento con IFN de células no infectadas resultó en la activación de la apoptosis, lo que sugiere que se requiere la presencia de algún componente viral o alguna señal intracelular generada durante la infección viral para inducir este proceso.

Nuestros datos señalan que el dsRNA de IBDV podría ser el principal factor desencadenante de la respuesta apoptótica. Así, hemos comprobado que mientras que los cultivos tratados con VLPs de IBDV no muestran efecto citopático alguno tras el tratamiento con IFN- α , en los cultivos transfectados con dsRNA de IBDV purificado

el tratamiento con IFN- α desencadena una respuesta similar a la observada en las células infectadas y tratadas con IFN- α . Por otra parte, los resultados obtenidos por qRT-PCR indican que en presencia de IFN el virus replica menos eficientemente. Esto sugiere que el dsRNA genómico de nueva síntesis podría no ser crítico para la respuesta apoptótica inducida por la administración de IFN. No obstante, no podemos descartar firmemente que el escaso aumento en la replicación viral detectado en estas condiciones entre las 4 y 12 h p.i. pueda inducir y/o contribuir a la respuesta apoptótica. En este sentido, se ha descrito la cooperación entre dsRNA y el IFN, tanto de tipo I como de tipo II, en la activación de una respuesta apoptótica en células pancreáticas β . Se ha descrito que esta activación ocurre a través de dos rutas complementarias, la ruta iniciada tras el reconocimiento del dsRNA por TLR3, que desencadena la activación de NF- κ B a través de la molécula adaptadora TRIF, y otra ruta mediada por STAT1 (163). Aunque nuestros resultados sugieren que TLR3 no debe jugar un papel crucial en la apoptosis observada en las diferentes líneas celulares analizadas no podemos descartar su participación.

Además, se ha señalado que el genoma desnudo de IBDV induce la expresión de *IFNB* en células DF-1 a través de su reconocimiento por el sensor citoplasmático MDA5, pero también se ha descrito que VP3 interfiere con este reconocimiento (164). Esto va de acuerdo con la idea de que VP3 se une al genoma viral ocultándolo de los sensores

celulares, previniendo de esta forma la inducción de la apoptosis mediada por PKR (93, 165). Sin embargo, se ha descrito que PKR participa en coordinación con MDA5 en el reconocimiento de RNA foráneo, donde la función de MDA5 sería facilitar la activación de PKR, probablemente mediante la eliminación de proteínas de unión a dicho RNA que interferirían con su activación (151). De acuerdo al modelo actualmente aceptado (33), según el cual tras la internalización del virus el dsRNA sería liberado al citoplasma celular en forma de RNPs, se podría especular que MDA5 actuaría eliminando la VP3 del dsRNA genómico al que se encuentra unida, y que dicha función aumentaría en presencia de IFN, ya que la expresión de MDA5 se induce por IFN. Esto llevaría a la activación de PKR, desencadenando la respuesta apoptótica, y la inducción de *IFNB*. En este sentido, la escasa acumulación de VP3 durante las primeras h p.i. podría facilitar este proceso, y justificaría el drástico efecto apoptótico del IFN cuando se añade a tiempos tempranos, mientras que el incremento de VP3 a tiempos tardíos se correlaciona con una reducción progresiva del efecto apoptótico del tratamiento con IFN cuando éste se añade a tiempos tardíos p.i.

Experimentos similares a los realizados en esta tesis doctoral han sido llevados a cabo en infecciones con el birnavirus que infecta especies acuáticas, IPNV (166). En concordancia con los resultados presentados en este trabajo, Skjesol y colaboradores señalan que el efecto inhibidor del IFN- α sobre la replicación de IPNV

es moderado cuando el IFN se añade a 4 h p.i., y más suave cuando se añade a las 10 h p.i., en comparación con la inhibición observada en células pretratadas con IFN. Esto indica que el virus es capaz de contrarrestar la respuesta antiviral inducida por IFN. Estos autores también muestran una reducción en la inducción de Mx en las células infectadas con IPNV y tratadas con IFN, indicando que algunos productos virales interfieren con la expresión de las ISGs. En este trabajo no observamos una reducción similar en la expresión de Mx e ISG-56, ni por *Western Blot* ni por qRT-PCR. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, sí se detecta una inhibición específica en la expresión de PKR en las células infectadas con IBDV y tratadas con IFN, con respecto a células no infectadas tratadas con IFN. Por otra parte, en este estudio no hacen mención alguna sobre el daño celular que pudiera originar la adición de IFN- α a cultivos infectados con IPNV. Sería interesante investigar si el tratamiento de células infectadas con IPNV y tratadas con IFN induce la activación de PKR y NF- κ B, tal y como hemos observado que ocurre con IBDV.

2. EFECTO DEL IFN SOBRE LA INFECCIÓN POR IBDV EN CÉLULAS DE POLLO

2.1. EL TRATAMIENTO CON $\text{chIFN-}\alpha$ DE CÉLULAS DF-1 INFECTADAS CON IBDV INDUCE APOPTOSIS DEPENDIENTE PARCIALMENTE DE PKR

Puesto que el hospedador natural de IBDV es el pollo, el efecto apoptótico observado en células humanas HeLa infectadas con IBDV tras

el tratamiento con IFN podría ser considerado como una respuesta artefactual, que no se correlacionase con el efecto que tendría en células de pollo. Sin embargo, nuestros resultados en células DF-1 sugieren que esta respuesta apoptótica es un evento determinado por la relación entre la infección por IBDV y la actividad del IFN.

Estos resultados nos llevaron a generar de manera satisfactoria células DF-1 carentes de la expresión de PKR, mediante el sistema CRISPR/Cas9. De la misma manera que en las células HeLa, parece ser que PKR desempeña un papel clave en la apoptosis desencadenada en estas células de pollo. No obstante, en ausencia de PKR la reducción de la apoptosis no es tan drástica como la observada en las células HeLa, lo que sugiere que en las células de pollo otra proteína junto con PKR podría ser responsable de mediar la respuesta apoptótica. Una posible candidata podría ser la RNasaL, que al igual que PKR se activa por dsRNA. Un ejemplo similar sería el caso del virus HCV, donde se ha descrito que la expresión de la poliproteína en células humanas produce apoptosis mediada fundamentalmente por estas dos proteínas, PKR y RNasaL (167). No obstante, en nuestro trabajo, la ausencia de degradación de los rRNAs en las células que presentan altos niveles de actividad de las caspasas indica que la RNasaL no está implicada en mediar la apoptosis desencadenada por IBDV en presencia de IFN, por lo que posiblemente otra proteína inducible por IFN- α pueda contribuir junto con PKR a la apoptosis inducida en células de pollo.

Nuevamente, los ensayos de pretratamiento indican un evidente efecto antiviral del IFN- α , ya que interfiere con la expresión de VP3. Además, este efecto se produce incluso cuando la infección se ha establecido previamente, y se ve reflejado en la reducción de la replicación del RNA viral, de la expresión de la proteína viral VP3 y del título viral extracelular. Por otra parte, al igual que en las células HeLa, los resultados en esta línea celular indican que PKR no es la responsable de la sensibilidad al tratamiento con IFN. Sin embargo, también coincidiendo con lo que ocurre en las células HeLa, los datos por qRT-PCR y *Western Blot* señalan un patrón inverso entre la expresión de Mx y VP3, pudiendo ser Mx responsable de esta sensibilidad a IFN. Como se ha mencionado anteriormente, existen evidencias de la participación de Mx en el control de la infección por birnavirus. Por una parte, se ha comprobado que la proteína Mx de salmón inhibe la replicación del birnavirus IPNV (150), y por otra, se ha descrito que la proteína Mx humana inhibe la replicación de IBDV (149). A este respecto, a diferencia de su homólogo humano, que presenta dos genes que codifican Mx (168, 169), en pollos se ha detectado de momento un único gen (169, 170). El efecto antiviral de la proteína Mx de pollo ha sido cuestionado, debido a la presencia de un polimorfismo en la posición 631 de esta proteína, que determina tanto su actividad antiviral como su distribución intracelular (173). Así, la sustitución de un residuo de Serina (Ser) por otro de Asparagina (Asn) confiere resistencia frente a la infección por VSV y por IAV (171). En el caso de IBDV, se ha descrito que

la protección antiviral desencadenada por el tratamiento con IFN- α en células embrionarias de pollo es independiente del polimorfismo de esta proteína (143). Estos resultados se pueden interpretar de diversas formas, y, por tanto, ni confirman ni desmienten la participación de Mx en el control de la infección por IBDV. No obstante, puede haber otras ISGs responsables de la inhibición de la replicación de IBDV, o que colaboren en esta función.

Los resultados obtenidos en células HeLa se ven afianzados por los obtenidos en células de pollo, donde se observa una correlación entre los niveles crecientes de inducción de *IFNB* y la respuesta apoptótica. A este respecto, en otros estudios se ha descrito la inducción del gen *IFNB* a tiempos tardíos de infección por IBDV en células DF-1 (172) y en macrófagos de pollo HD11 (173). Al igual que en las células HeLa, los resultados de expresión génica por qRT-PCR en células DF-1 indican que la inducción de *IFNB* es dependiente de PKR, si bien en las células tratadas con IFN- α las diferencias de expresión de *IFNB* en ausencia y presencia de PKR no son tan acusadas como en las células HeLa, lo que indica la participación de otro factor celular bajo estas condiciones. En este sentido, se ha descrito que PKR no es esencial para la expresión de IFN- α/β en infecciones de células MEFs con el virus SFV, pero si contribuye, ya que aunque el silenciamiento de PKR en estas células no impide la transcripción del gen de IFN- β , los niveles de inducción son menores respecto a las células control (147). De la misma forma, PKR podría contribuir a aumentar la

inducción de IFN- β en las células infectadas con IBDV, aunque parece no ser imprescindible para su expresión en células DF-1. No obstante, se requeriría un estudio adicional para confirmar si dicha inducción contribuye a maximizar el efecto apoptótico en estas células, o, lo que es más importante, estudiar su contribución en la destrucción de los linfocitos B *in vivo*.

Por otro lado, al igual que en las células HeLa infectadas en ausencia de IFN, IBDV es capaz de inducir por sí sólo apoptosis en células DF-1. Incluso se puede observar una inducción gradual de *IFNB* que coincide con el aumento progresivo de la respuesta apoptótica a 12 y 16 h p.i., aunque no a los mismos niveles que células infectadas sometidas al tratamiento con IFN. Por lo tanto, en estas células observamos el mismo patrón que en las células HeLa, si bien la infección progresa más deprisa, y por tanto los tiempos se acortan.

2.2. OTRO FACTOR PRO-APOPTÓTICO, DIFERENTE A TNF- α Y TRAIL, PARECE MEDIAR LA RESPUESTA APOPTÓTICA EN CÉLULAS DF-1

Los resultados de expresión génica por qRT-PCR indican que ni TNF- α ni TRAIL participan en la respuesta apoptótica desencadenada por IBDV en presencia de IFN en las células DF-1. Sin embargo, no podemos descartar su participación *in vivo*, ya que se ha observado la producción de TNF- α por macrófagos durante la infección con IBDV en la bolsa de Fabricio. Por otro lado, se ha descrito la activación de la ruta FasL/Fas en pollos infectados con IBDV,

como resultado de la infiltración de linfocitos T CD8+ al órgano bursal. Los autores señalan que estas células T secretan tanto IFN- γ como FasL, y sugieren que este último puede unirse a su receptor en la superficie de las células bursales, desencadenando una apoptosis mediada por caspasas (174). Por lo tanto, este receptor de muerte junto con su ligando podrían también ser los responsables de la ejecución de la apoptosis en las células DF-1 desencadenada bajo nuestras condiciones de trabajo. En este sentido, se ha descrito que PKR está implicada en la activación de la apoptosis desencadenada por VSV y EBV a través de Fas (175, 176). En el caso de VSV se ha demostrado que este efecto se produce de manera independiente de FasL (175). Por otra parte, nuestros resultados en células HeLa señalan por primera vez la relación entre la activación de NF- κ B con la apoptosis inducida bajo la exposición a IFN durante la infección por IBDV. En este contexto, hay que señalar que NF- κ B participa en la activación de la transcripción de Fas (177). Sin embargo, nuestros intentos por analizar la expresión de Fas no han dado resultado alguno, debido a la falta de anticuerpos adecuados frente a la proteína Fas de pollo.

En este contexto, la activación de la ruta I κ B/NF- κ B a través de PKR (178) y el control transcripcional de la expresión génica de citoquinas como TNF- α (179) y FasL o IFN tipo I (180) es un mecanismo bien establecido (124). En células HeLa parece ser que este mecanismo es decisivo en la inducción de la respuesta apoptótica. Sin embargo, en las células

DF-1 parece podría ser necesaria además la inducción de la transcripción de genes como FasL u otros factores pro-apoptóticos, de una forma independiente de PKR.

2.3. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DT40 INFECTADAS Y TRATADAS CON IFN

La infección por IBDV en pollos no sólo conduce a la inducción de IFN tipo I. Al inicio de la infección se produce una infiltración de linfocitos T y macrófagos en la bolsa de Fabricio, donde se está produciendo la replicación del virus, y estos linfocitos T bursales se activan y secretan IFN- γ al igual que otras muchas citoquinas y quimioquinas (181, 182). Por otra parte, como se ha descrito anteriormente, la producción de IFN- γ se ha asociado con la inmunosupresión y la patogenia causadas por IBDV (47). Los resultados de este trabajo demuestran que el tratamiento con chIFN- α o chIFN- γ en células DT40 previamente infectadas con IBDV provoca la activación de la apoptosis, confirmando que este suceso es independiente de la línea celular empleada, y que ambos tipos de IFN son capaces de desencadenarlo.

Nuevamente, los resultados de expresión de chIFN- β se relacionan directamente con la activación de las caspasas 3 y 7. Sin embargo, al igual que en las células DF-1, ni TNF- α ni TRAIL parecen participar en esta apoptosis. De los datos de expresión por qRT-PCR en células de pollo, DF-1 y DT40, se podría pensar que el reconocimiento del dsRNA viral debe estar mediado por MDA5, dados un patrón de expresión.

Esto estaría de acuerdo con trabajos previos en los que se ha descrito el reconocimiento del RNA de IBDV por MDA5 en células DF-1 (172) y en la línea celular de macrófagos de pollo DH11 (173). Por el contrario, el perfil de TLR3, que muestra una inducción mínima tanto en el contexto de la infección como en células no infectadas, indica que este factor no estaría implicado en el reconocimiento del RNA viral, y en la consecuente inducción de chIFN- β y de la apoptosis, aunque esto requiere ser confirmado.

Por otra parte, se podría pensar en una mayor susceptibilidad de las células DT40 frente a la infección, ya que estas podrían considerarse como la línea celular hospedadora más cercana al sistema natural de infección por IBDV. Sin embargo, nuestros resultados sugieren una menor sensibilidad a la infección y al tratamiento con IFN respecto a las células DF-1, que se refleja en un cierto retraso en la activación de la apoptosis en presencia del tratamiento con chIFN. Además, los ensayos de pretratamiento con ambos tipos de chIFN señalan una menor sensibilidad al efecto antiviral de IFN que los obtenidos en células HeLa y DF-1, siendo prácticamente nula cuando estos son añadidos tras la infección. La escasa sensibilidad de IBDV al pretratamiento con chIFN- γ coincide con resultados obtenidos en el caso de IPNV en células pretratadas con el IFN- γ de salmón, donde se observa que este posee una reducida actividad antiviral específica frente a IPNV (183). Por otra parte, cabe mencionar que las células DT40 se encuentran

persistentemente infectadas con un retrovirus, lo que podría modificar su respuesta natural frente a la infección con IBDV. No obstante, su utilización nos acerca a entender el papel de IFN sobre la patogenia causada por IBDV, y de este modo, contrastar la veracidad de nuestra hipótesis establecida en base a los resultados obtenidos en otras líneas celulares.

Nuestros hallazgos proporcionan nuevas evidencias del mecanismo potencial de inducción de la inmunosupresión y la patogenia en pollos causada por la infección con IBDV. No obstante, es necesario investigar si el mecanismo descrito en esta tesis doctoral podría contribuir a una temprana eliminación de las células infectadas, limitando de esta forma la diseminación del virus, y reduciendo la patología de la enfermedad, o, si, por el contrario, esto contribuye a la eliminación de los linfocitos B y a la inmunodepresión. Parece probable que el balance entre ambos efectos, opuestos entre ellos, pueda estar dramáticamente afectado por el fondo genético tanto del hospedador como de la cepa infectiva. En este sentido, en varios laboratorios se han llevado a cabo estudios con pollos con diferente fondo genético, que difieren en la susceptibilidad frente a la infección con IBDV. Por un lado, diferentes autores indican que durante la fase temprana de la infección existe una gran circulación de IFN tipo I junto con citoquinas proinflamatorias. Esto conduce a un desarrollo más rápido y severo de las lesiones y de la sintomatología asociada a la patología (36, 184). Sin embargo, Ruby y colaboradores (185)

proponen un modelo de resistencia, donde una rápida respuesta inflamatoria, acompañada por una fuerte respuesta apoptótica podría llevar a una limitada replicación viral, y por lo tanto, a una menor patología. Para ello, los autores comparan el perfil de expresión génica que existe en la bolsa de Fabricio entre líneas de pollos susceptibles y resistentes a diferentes días p.i. Durante los estadios tempranos de la infección, los pollos de la línea resistente muestran una inducción significativa de genes involucrados en la respuesta inflamatoria, incluyendo IFN- α e IFN- γ . Aunque la infección produce una gran reducción de linfocitos B en ambas líneas, sorprendentemente, en la línea resistente esta reducción es mayor.

Por otro lado, podría ser interesante analizar el efecto del tratamiento con IFN en el contexto de la infección en pollos. Existe un único estudio publicado en el que se describe que en pollos inmunizados con una vacuna inactivada comercial, el tratamiento con chIFN- β antes de la infección con IBDV atenúa la patología causada por el virus (121), lo cual coincide con los experimentos realizados *in vitro*. No obstante, el estudio del efecto del tratamiento con IFN en el curso de una infección previamente establecida con una cepa atenuada de IBDV, podría ayudar a entender la contribución potencial de IFN sobre la patogénesis inducida por IBDV.

Desde nuestro punto de vista, nuestros resultados recapitulan el efecto catastrófico de la tormenta de citoquinas descrita en pollos

infectados experimentalmente. Esto indica que la sobre-producción *in vivo* de IFN por macrófagos y linfocitos T durante la infección con IBDV sería responsable de la muerte masiva por apoptosis de linfocitos, pudiendo ejercer un efecto patogénico en lugar de uno protector. Este trabajo ha contribuido por primera vez a elucidar un mecanismo clave en la muerte por apoptosis en células infectadas con IBDV bajo el tratamiento con IFN, estableciendo una conexión clara entre la producción de IFN y la citopatogenicidad causada por IBDV.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se proponen las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento con IFN tras la infección con IBDV induce apoptosis tanto en la línea celular humana HeLa como en las líneas celulares de pollo, DF-1 y DT40.
2. Los IFN tipo I, IFN- α e IFN- β , y el IFN tipo II, IFN- γ , son capaces de desencadenar el proceso de apoptosis en las células humanas HeLa y en las células de pollo DF-1 infectadas con IBDV.
3. La inducción de apoptosis tras la infección con IBDV y el tratamiento con IFN está mediada por PKR en las células HeLa, y parcialmente en las células DF-1.
4. TNF- α y NF- κ B son mediadores esenciales en la inducción de apoptosis en las células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN- α .
5. PKR no es la responsable de la sensibilidad de IBDV a la acción antiviral de IFN, ni en las células HeLa ni en las células DF-1.
6. La activación de la respuesta apoptótica coincide con la inducción de IFNB dependiente de PKR tanto en las células HeLa como en las células DF-1, aunque su importancia en este proceso está por determinar.
7. El dsRNA genómico de IBDV es el factor viral que desencadena la activación de la apoptosis en células tratadas con IFN.
8. La activación de la apoptosis en las células HeLa infectadas con IBDV y tratadas con IFN ocurre en mayor medida a través de la ruta extrínseca, aunque ambas rutas participan.
9. En ausencia del tratamiento con IFN, IBDV es capaz de inducir la activación de la apoptosis a tiempos tardíos post infección.

REFERENCIAS

1. Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DT, Becht H, Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of virology*. 1979;32(2):593-605.
2. van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech*. 2000;19(2):509-43.
3. Ingraio F, Rauw F, Lambrecht B, van den Berg T. Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Dev Comp Immunol*. 2013;41(3):429-38.
4. Mundt E, Kollner B, Kretzschmar D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *Journal of virology*. 1997;71(7):5647-51.
5. Mendez F, de Garay T, Rodriguez D, Rodriguez JF. Infectious bursal disease virus VP5 polypeptide: a phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123470.
6. Chevalier C, Lepault J, Erk I, Da Costa B, Delmas B. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *Journal of virology*. 2002;76(5):2384-92.
7. Sanchez AB, Rodriguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999;262(1):190-9.
8. von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirrmeier H, Behrens SE, Letzel T, Mundt E. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 8):2221-9.
9. Luque D, Saugar I, Rejas MT, Carrascosa JL, Rodriguez JF, Caston JR. Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol*. 2009;386(3):891-901.
10. Pan J, Vakharia VN, Tao YJ. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7385-90.
11. Xu H-T, Si W-D, Dobos P. Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology*. 2004;322(1):199-210.
12. Caston JR, Martinez-Torrecuadrada JL, Maraver A, Lombardo E, Rodriguez JF, Casal JI, et al. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *Journal of virology*. 2001;75(22):10815-28.
13. Luque D, Saugar I, Rodriguez JF, Verdaguer N, Garriga D, Martin CS, et al. Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *Journal of virology*. 2007;81(13):6869-78.
14. Maraver A, Clemente R, Rodriguez JF, Lombardo E. Identification and Molecular Characterization of the RNA Polymerase-Binding Motif of Infectious Bursal Disease Virus Inner Capsid Protein VP3. *Journal of virology*. 2003;77(4):2459-68.

15. Hjalmarsson A, Carlemalm E, Everitt E. Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *Journal of virology*. 1999;73(4):3484-90.
16. Luque D, Rivas G, Alfonso C, Carrascosa JL, Rodriguez JF, Caston JR. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2148-52.
17. Reinisch KM. The dsRNA Viridae and their catalytic capsids. *Nat Struct Biol*. 2002;9(10):714-6.
18. Lawton JA, Estes MK, Prasad BV. Three-dimensional visualization of mRNA release from actively transcribing rotavirus particles. *Nat Struct Biol*. 1997;4(2):118-21.
19. Coulibaly F, Chevalier C, Gutsche I, Pous J, Navaza J, Bressanelli S, et al. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*. 2005;120(6):761-72.
20. Dalton RM, Rodriguez JF. Rescue of infectious birnavirus from recombinant ribonucleoprotein complexes. *PLoS One*. 2014;9(1):e87790.
21. Kochan G, Gonzalez D, Rodriguez JF. Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol*. 2003;148(4):723-44.
22. Tan SL, Katze MG. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res*. 1998;18(9):757-66.
23. Romano PR, Zhang F, Tan SL, Garcia-Barrio MT, Katze MG, Dever TE, et al. Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol Cell Biol*. 1998;18(12):7304-16.
24. Lombardo E, Maraver A, Caston JR, Rivera J, Fernandez-Arias A, Serrano A, et al. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of virology*. 1999;73(8):6973-83.
25. Garriga D, Navarro A, Querol-Audi J, Abaitua F, Rodriguez JF, Verdaguer N. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20540-5.
26. Delgui L, Ona A, Gutierrez S, Luque D, Navarro A, Caston JR, et al. The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology*. 2009;386(2):360-72.
27. Lin TW, Lo CW, Lai SY, Fan RJ, Lo CJ, Chou YM, et al. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *Journal of virology*. 2007;81(16):8730-41.
28. Yip CW, Hon CC, Zeng F, Leung FC. Cell culture-adapted IBDV uses endocytosis for entry in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. *Virus Res*. 2012;165(1):9-16.

29. Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Curr Biol*. 1998;8(24):1335-8.
30. Garriga D, Querol-Audi J, Abaitua F, Saugar I, Pous J, Verdaguer N, et al. The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *Journal of virology*. 2006;80(14):6895-905.
31. Da Costa B, Chevalier C, Henry C, Huet JC, Petit S, Lepault J, et al. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *Journal of virology*. 2002;76(5):2393-402.
32. Galloux M, Libersou S, Morellet N, Bouaziz S, Da Costa B, Ouldali M, et al. Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20774-84.
33. Delgui LR, Rodriguez JF, Colombo MI. The endosomal pathway and the Golgi complex are involved in the infectious bursal disease virus life cycle. *Journal of virology*. 2013;87(16):8993-9007.
34. Chandran K, Nibert ML. Animal cell invasion by a large nonenveloped virus: reovirus delivers the goods. *Trends Microbiol*. 2003;11(8):374-82.
35. Mendez F, Romero N, Cubas LL, Delgui LR, Rodriguez D, Rodriguez JF. Non-Lytic Egression of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Particles from Infected Cells. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170080.
36. Aricibasi M, Jung A, Heller ED, Rautenschlein S. Differences in genetic background influence the induction of innate and acquired immune responses in chickens depending on the virulence of the infecting infectious bursal disease virus (IBDV) strain. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;135(1-2):79-92.
37. Cheville NF. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. *Am J Pathol*. 1967;51(4):527-51.
38. Becht H. Infectious bursal disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1980;90:107-21.
39. Mahgoub HA, Bailey M, Kaiser P. An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol*. 2012;157(11):2047-57.
40. Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK, Lake RS. Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA). *Avian Dis*. 1967;11(3):438-45.
41. Yamaguchi T, Setiyono A, Kobayashi M, Takigami S, Fukushi H, Hirai K. Infectious bursal disease live vaccines: changes in the virus population during serial passage in chickens and chicken embryo fibroblast cells. *Avian Dis*. 2000;44(2):284-90.
42. Block H, Meyer-Block K, Rebeski DE, Scharr H, de Wit S, Rohn K, et al. A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathol*. 2007;36(5):401-9.
43. Berg TP, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol*. 1991;20(3):409-

- 21.
44. Rodenberg J, Sharma JM, Belzer SW, Nordgren RM, Naqi S. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 1994;38(1):16-21.
45. Inoue M, Yamamoto H, Matuo K, Hihara H. Susceptibility of chicken monocytic cell lines to infectious bursal disease virus. *J Vet Med Sci.* 1992;54(3):575-7.
46. Sharma JM, Kim I-J, Rautenschlein S, Yeh H-Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental & Comparative Immunology.* 2000;24(2-3):223-35.
47. Rauw F, Lambrecht B, van den Berg T. Pivotal role of ChIFN γ in the pathogenesis and immunosuppression of infectious bursal disease. *Avian Pathol.* 2007;36(5):367-74.
48. Kim IJ, Karaca K, Pertile TL, Erickson SA, Sharma JM. Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;61(2-4):331-41.
49. Lam KM. Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J Comp Pathol.* 1997;116(4):367-77.
50. Vasconcelos AC, Lam KM. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus. *J Comp Pathol.* 1995;112(4):327-38.
51. Ojeda F, Skardova I, Guarda MI, Ulloa J, Folch H. Proliferation and apoptosis in infection with infectious bursal disease virus: a flow cytometric study. *Avian Dis.* 1997;41(2):312-6.
52. Nieper H, Teifke JP, Jungmann A, Lohr CV, Muller H. Infected and apoptotic cells in the IBDV-infected bursa of Fabricius, studied by double-labelling techniques. *Avian Pathol.* 1999;28(3):279-85.
53. Vasconcelos AC, Lam KM. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *The Journal of general virology.* 1994;75 (Pt 7):1803-6.
54. Shahsavandi S, Ebrahimi MM, Sadeghi K, Mahravani H. Apoptotic response of chicken embryonic fibroblast cells to infectious bursal disease virus infections reflects viral pathogenicity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2014;50(9):858-64.
55. Rodriguez-Lecompte JC, Nino-Fong R, Lopez A, Frederick Markham RJ, Kibenge FS. Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2005;28(4):321-37.
56. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001;8(2):113-26.
57. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature.* 2000;407(6805):796-801.
58. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol.* 2002;31(4):214-23.
59. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and

beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-32.

60. Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:35-56.

61. O'Brien MA, Moravec RA, Riss TL. Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *Biotechniques.* 2001;30(4):886-91.

62. Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell.* 2003;95(3-4):141-56.

63. Marissen WE, Lloyd RE. Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Mol Cell Biol.* 1998;18(12):7565-74.

64. Tsuchiya Y, Nakabayashi O, Nakano H. FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):30321-41.

65. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2016.

66. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995;81(4):505-12.

67. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999;13(24):3179-84.

68. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94(4):491-501.

69. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(6):401-10.

70. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993;53(19):4701-14.

71. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.* 2006;11(4):506-25.

72. Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272(15):9621-4.

73. Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, et al. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(4):1172-6.

74. Barton GM. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol.* 2007;19(1):33-40.

75. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on

Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.

76. Chen S, Cheng A, Wang M. Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds. *Vet Res.* 2013;44:82.

77. St Paul M, Barjesteh N, Paolucci S, Pei Y, Sharif S. Toll-like receptor ligands induce the expression of interferon-gamma and interleukin-17 in chicken CD4+ T cells. *BMC Res Notes.* 2012;5:616.

78. Philbin VJ, Iqbal M, Boyd Y, Goodchild MJ, Beal RK, Bumstead N, et al. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology.* 2005;114(4):507-21.

79. Matsumiya T, Stafforini DM. Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Crit Rev Immunol.* 2010;30(6):489-513.

80. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature.* 2007;446(7138):916-20.

81. Liniger M, Summerfield A, Zimmer G, McCullough KC, Ruggli N. Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. *Journal of virology.* 2012;86(2):705-17.

82. Díaz-Beneitez E, CLL, Sánchez-Aparicio M.T., García-Sastre A., Rodríguez J.F. and Rodríguez D. Interaction between TRIM25 and MDA5 in chicken cells and their role in mediated antiviral activity upon IBDV infection. *Cádiz: Congreso Nacional de Virología XIV; 2017.*

83. Belgnaoui SM, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(5):564-72.

84. Zinzula L, Tramontano E. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: hide, mask, hit. *Antiviral Res.* 2013;100(3):615-35.

85. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513-45.

86. Galani IE, Koltsida O, Andreacos E. Type III interferons (IFNs): Emerging Master Regulators of Immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2015;850:1-15.

87. Ponten A, Sick C, Weeber M, Haller O, Kochs G. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *Journal of virology.* 1997;71(4):2591-9.

88. Schwarz H, Harlin O, Ohnemus A, Kaspers B, Staeheli P. Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. *J Interferon Cytokine Res.* 2004;24(3):179-84.

89. Magor KE, Miranzo Navarro D, Barber MR, Petkau K, Fleming-Canepa X, Blyth GA, et al. Defense genes missing from the flight division. *Dev Comp Immunol.* 2013;41(3):377-88.

90. Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-

stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology*. 1995;214(1):222-8.

91. Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*. 2009;5(5):439-49.

92. Sarkar SN, Sen GC. Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol Ther*. 2004;103(3):245-59.

93. Busnadiego I, Maestre AM, Rodriguez D, Rodriguez JF. The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS One*. 2012;7(10):e46768.

94. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*. 1990;62(2):379-90.

95. Patel RC, Sen GC. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J*. 1998;17(15):4379-90.

96. Balachandran S, Roberts PC, Kipperman T, Bhalla KN, Compans RW, Archer DR, et al. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *Journal of virology*. 2000;74(3):1513-23.

97. Gil J, Garcia MA, Esteban M. Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett*. 2002;529(2-3):249-55.

98. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004;25(6):280-8.

99. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18(18):2195-224.

100. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*. 2005;6(10):981-8.

101. Baichwal VR, Baeuerle PA. Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol*. 1997;7(2):R94-6.

102. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in cell biology*. 2001;11(9):372-7.

103. Hardwick JM. Viral interference with apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*. 1998;9(3):339-49.

104. Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RK, Drexler HC, Rotello RJ, Fishman MC, et al. Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science*. 1994;263(5148):826-8.

105. Tran AT, Cortens JP, Du Q, Wilkins JA, Coombs KM. Influenza virus induces apoptosis via BAD-mediated mitochondrial dysregulation. *Journal of virology*. 2013;87(2):1049-60.

106. Everett H, McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol*. 1999;7(4):160-5.

107. Liu M, Vakharia VN. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *Journal of virology*. 2006;80(7):3369-77.

108. Li Z, Wang Y, Xue Y, Li X, Cao H, Zheng SJ. Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *Journal of virology*. 2012;86(3):1328-38.
109. Fernandez-Arias A, Martinez S, Rodriguez JF. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *Journal of virology*. 1997;71(10):8014-8.
110. Fernandez-Escobar M, Najera JL, Baldanta S, Rodriguez D, Way M, Esteban M, et al. Suppression of NYVAC Infection in HeLa Cells Requires RNase L but Is Independent of Protein Kinase R Activity. *J Virol*. 2015;90(4):2135-41.
111. Dulbecco R, Freeman G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*. 1959;8(3):396-7.
112. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990;96(1):23-8.
113. Park MS, Shaw ML, Munoz-Jordan J, Cros JF, Nakaya T, Bouvier N, et al. Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J Virol*. 2003;77(2):1501-11.
114. Ward GA, Stover CK, Moss B, Fuerst TR. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(15):6773-7.
115. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-6.
116. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 1998;72(11):8463-71.
117. Friesland M, Mingorance L, Chung J, Chisari FV, Gastaminza P. Sigma-1 receptor regulates early steps of viral RNA replication at the onset of hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2013;87(11):6377-90.
118. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016;5(2):85-6.
119. McAllister CS, Samuel CE. The RNA-activated protein kinase enhances the induction of interferon-beta and apoptosis mediated by cytoplasmic RNA sensors. *J Biol Chem*. 2009;284(3):1644-51.
120. Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One*. 2009;4(5):e5553.
121. Mo CW, Cao YC, Lim BL. The in vivo and in vitro effects of chicken interferon alpha on infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus infection. *Avian Dis*. 2001;45(2):389-99.
122. Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*. 2002;7(4):321-8.
123. Ezelle HJ, Malathi K, Hassel BA. The Roles of RNase-L in Antimicrobial Immunity and the

Cytoskeleton-Associated Innate Response. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1).

124. Garcia MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(4):1032-60.
125. Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH, DiDonato JA, Williams BR. NF-kappaB activation by double-stranded-RNA-activated protein kinase (PKR) is mediated through NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase. *Mol Cell Biol.* 2000;20(4):1278-90.
126. Royds JA, Dower SK, Qwarnstrom EE, Lewis CE. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *Mol Pathol.* 1998;51(2):55-61.
127. Han YH, Moon HJ, You BR, Park WH. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol Rep.* 2009;22(1):215-21.
128. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene.* 2006;25(51):6887-99.
129. Oshiumi H, Kouwaki T, Seya T. Accessory Factors of Cytoplasmic Viral RNA Sensors Required for Antiviral Innate Immune Response. *Front Immunol.* 2016;7:200.
130. Lei Y, Moore CB, Liesman RM, O'Connor BP, Bergstralh DT, Chen ZJ, et al. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One.* 2009;4(5):e5466.
131. Jammi NV, Whitby LR, Beal PA. Small molecule inhibitors of the RNA-dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003;308(1):50-7.
132. Shimazawa M, Hara H. Inhibitor of double stranded RNA-dependent protein kinase protects against cell damage induced by ER stress. *Neurosci Lett.* 2006;409(3):192-5.
133. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
134. Barber MR, Aldridge JR, Jr., Webster RG, Magor KE. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(13):5913-8.
135. Tanaka N, Sato M, Lamphier MS, Nozawa H, Oda E, Noguchi S, et al. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 1998;3(1):29-37.
136. Fernandez S, Tanaskovic S, Helbig K, Rajasuriar R, Kramski M, Murray JM, et al. CD4+ T-cell deficiency in HIV patients responding to antiretroviral therapy is associated with increased expression of interferon-stimulated genes in CD4+ T cells. *The Journal of infectious diseases.* 2011;204(12):1927-35.
137. Tejaro JR, Ng C, Lee AM, Sullivan BM, Sheehan KC, Welch M, et al. Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling. *Science.* 2013;340(6129):207-11.
138. Wilson EB, Yamada DH, Elsaesser H, Herskovitz J, Deng J, Cheng G, et al. Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science.* 2013;340(6129):202-7.
139. Summerfield A, Alves M, Ruggli N, de Bruin MG, McCullough KC. High IFN-alpha responses associated with depletion of lymphocytes and natural IFN-producing cells during classical swine

fever. *J Interferon Cytokine Res.* 2006;26(4):248-55.

140. Rue CA, Susta L, Cornax I, Brown CC, Kapczynski DR, Suarez DL, et al. Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 4):931-9.

141. Moulin HR, Liniger M, Python S, Guzylack-Piriou L, Ocana-Macchi M, Ruggli N, et al. High interferon type I responses in the lung, plasma and spleen during highly pathogenic H5N1 infection of chicken. *Vet Res.* 2011;42:6.

142. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe.* 2016;19(2):181-93.

143. O'Neill AM, Livant EJ, Ewald SJ. Interferon alpha-induced inhibition of infectious bursal disease virus in chicken embryo fibroblast cultures differing in Mx genotype. *Avian Dis.* 2010;54(2):802-6.

144. Robertsen B, Bergan V, Rokenes T, Larsen R, Albuquerque A. Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J Interferon Cytokine Res.* 2003;23(10):601-12.

145. Kaufman RJ. Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(21):11693-5.

146. de Haro C, Mendez R, Santoyo J. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.* 1996;10(12):1378-87.

147. Barry G, Breakwell L, Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Rodriguez-Andres J, Kohl A, et al. PKR acts early in infection to suppress Semliki Forest virus production and strongly enhances the type I interferon response. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 6):1382-91.

148. Gamil AA, Xu C, Mutoloki S, Evensen O. PKR Activation Favors Infectious Pancreatic Necrosis Virus Replication in Infected Cells. *Viruses.* 2016;8(6).

149. Mundt E. Human MxA protein confers resistance to double-stranded RNA viruses of two virus families. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 4):1319-23.

150. Larsen R, Rokenes TP, Robertsen B. Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *Journal of virology.* 2004;78(15):7938-44.

151. Pham AM, Santa Maria FG, Lahiri T, Friedman E, Marie IJ, Levy DE. PKR Transduces MDA5-Dependent Signals for Type I IFN Induction. *PLoS pathogens.* 2016;12(3):e1005489.

152. Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, Rogers NC, Scheuner D, Kato H, et al. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe.* 2010;7(5):354-61.

153. Barry G, Breakwell L, Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Rodriguez-Andres J, Kohl A, et al. PKR acts early in infection to suppress Semliki Forest virus production and strongly enhances the type I interferon response. *The Journal of General Virology.* 2009;90(Pt 6):1382-91.

154. Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by

positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 1998;17(22):6660-9.

155. Mack EA, Kallal LE, Demers DA, Biron CA. Type 1 interferon induction of natural killer cell gamma interferon production for defense during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *MBio.* 2011;2(4).

156. Ghosh S, Dasso JF. Study of pathway cross-talk interactions with NF-kappaB leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene.* 2016;584(1):97-109.

157. Jing H, Lee S. NF-kappaB in cellular senescence and cancer treatment. *Molecules and cells.* 2014;37(3):189-95.

158. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *European journal of biochemistry.* 2000;267(12):3828-35.

159. Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 1999;274(2):987-92.

160. Clarke P, Richardson-Burns SM, DeBiasi RL, Tyler KL. Mechanisms of apoptosis during reovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;289:1-24.

161. Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med.* 2000;192(8):F21-5.

162. Maestre AM, Garzon A, Rodriguez D. Equine coronavirus (BEV) induces caspase-mediated apoptosis in infected cells. *PLoS One.* 2011;6(6):e20972.

163. Rasschaert J, Ladriere L, Urbain M, Dogusan Z, Katabua B, Sato S, et al. Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 2005;280(40):33984-91.

164. Ye C, Jia L, Sun Y, Hu B, Wang L, Lu X, et al. Inhibition of antiviral innate immunity by birnavirus VP3 protein via blockage of viral double-stranded RNA binding to the host cytoplasmic RNA detector MDA5. *Journal of virology.* 2014;88(19):11154-65.

165. Valli A, Busnadiego I, Maliogka V, Ferrero D, Caston JR, Rodriguez JF, et al. The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes. *PLoS One.* 2012;7(9):e45957.

166. Skjesol A, Aamo T, Hegseth MN, Robertsen B, Jorgensen JB. The interplay between infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and the IFN system: IFN signaling is inhibited by IPNV infection. *Virus Res.* 2009;143(1):53-60.

167. Gomez CE, Vandermeeren AM, Garcia MA, Domingo-Gil E, Esteban M. Involvement of PKR and RNase L in translational control and induction of apoptosis after Hepatitis C polyprotein expression from a vaccinia virus recombinant. *Viol J.* 2005;2:81.

168. Horisberger MA, Wathlet M, Szpirer J, Szpirer C, Islam Q, Levan G, et al. cDNA cloning and assignment to chromosome 21 of IFI-78K gene, the human equivalent of murine Mx gene. *Somatic cell and molecular genetics.* 1988;14(2):123-31.

169. Haller O, Staeheli P, Schwemmler M, Kochs G. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends Microbiol.* 2015;23(3):154-63.
170. Verhelst J, Hulpiau P, Saelens X. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(4):551-66.
171. Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, et al. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. *Genome Res.* 2002;12(4):595-601.
172. Lee CC, Wu CC, Lin TL. Chicken melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) recognizes infectious bursal disease virus infection and triggers MDA5-related innate immunity. *Arch Virol.* 2014;159(7):1671-86.
173. Lee CC, Wu CC, Lin TL. Role of chicken melanoma differentiation-associated gene 5 in induction and activation of innate and adaptive immune responses to infectious bursal disease virus in cultured macrophages. *Arch Virol.* 2015;160(12):3021-35.
174. Rauf A, Khatri M, Murgia MV, Saif YM. Fas/FasL and perforin-granzyme pathways mediated T cell cytotoxic responses in infectious bursal disease virus infected chickens. *Results Immunol.* 2012;2:112-9.
175. Gaddy DF, Lyles DS. Oncolytic vesicular stomatitis virus induces apoptosis via signaling through PKR, Fas, and Daxx. *Journal of virology.* 2007;81(6):2792-804.
176. Samanta M, Takada K. Modulation of innate immunity system by Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. *Cancer science.* 2010;101(1):29-35.
177. Liu F, Bardhan K, Yang D, Thangaraju M, Ganapathy V, Waller JL, et al. NF-kappaB directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis and tumor suppression. *J Biol Chem.* 2012;287(30):25530-40.
178. Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6288-92.
179. Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell research.* 2005;15(1):24-7.
180. Rubio D, Xu R-H, Remakus S, Krouse TE, Truckenmiller ME, Thapa RJ, et al. Cross-talk between the Type 1 interferon and Nuclear Factor Kappa B pathways confers resistance to a lethal virus infection. *Cell host & microbe.* 2013;13(6):701-10.
181. Smith J, Sadeyen JR, Butter C, Kaiser P, Burt DW. Analysis of the early immune response to infection by infectious bursal disease virus in chickens differing in their resistance to the disease. *Journal of virology.* 2015;89(5):2469-82.
182. Eldaghayes I, Rothwell L, Williams A, Withers D, Balu S, Davison F, et al. Infectious bursal disease virus: strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. *Viral immunology.* 2006;19(1):83-91.
183. Sun B, Skjæveland I, Svingerud T, Zou J, Jorgensen J, Robertsen B. Antiviral activity of

salmonid gamma interferon against infectious pancreatic necrosis virus and salmonid alphavirus and its dependency on type I interferon. *Journal of virology*. 2011;85(17):9188-98.

184. Tippenhauer M, Heller DE, Weigend S, Rautenschlein S. The host genotype influences infectious bursal disease virus pathogenesis in chickens by modulation of T cells responses and cytokine gene expression. *Dev Comp Immunol*. 2013;40(1):1-10.

185. Ruby T, Whittaker C, Withers DR, Chelbi-Alix MK, Morin V, Oudin A, et al. Transcriptional profiling reveals a possible role for the timing of the inflammatory response in determining susceptibility to a viral infection. *Journal of virology*. 2006;80(18):9207-16.